



FUNÇÃO DAS MARCAS ODORÍFERAS EM *MICROTUS CABRERAE* (THOMAS, 1906)

Luis Alexandre Piteira Gomes

Tese apresentada à Universidade de Évora
para obtenção do Grau de Doutor em Biologia

ORIENTADORES: *António Paulo Pereira Mira*
Eduardo Nuno Barata

ÉVORA, JANEIRO DE 2013



Pesquisa realizada no Departamento de Biologia da Universidade de Évora, e no Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas da Universidade de Évora.

Esta pesquisa foi financiada por uma bolsa de Doutoramento da Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BD/23699/2005) e por uma bolsa do Programa Bento de Jesus Caraça da Universidade de Évora.

Esta tese deve ser citada da seguinte forma:

Gomes, L (2013) Função das marcas odoríferas em *Microtus cabreræ* (Thomas, 1906).

Tese de Doutoramento, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

AGRADECIMENTOS

Esta tese não reflete o esforço de uma pessoa apenas, mas também uma combinação de esforços de várias outras. Assim, gostaria de expressar a minha gratidão a todos aqueles que para ela contribuíram de forma direta ou indireta.

Antes de tudo, nada disto seria possível sem o apoio incondicional, a amizade, o amor, e a paciência da minha esposa Lena e da minha Pequena Grande Ana Rita. Obrigado!

Também estou grato à minha mãe, ao meu pai, à minha avó Maria do Carmo e ao meu avô Manuel João, pela sua amizade, pelo seu apoio e disponibilidade.

Estou igualmente grato aos meus sobrinhos, João e Pedro, pela ajuda incansável e pela companhia ao longo destes últimos anos.

Obrigado aos amigos de sempre, na companhia dos quais passei valorosos momentos, de trabalho, ou não! Todos eles foram essenciais para levar a bom termo este trabalho. Sem pretensão de me lembrar de todos, aqui vai: Carlos Godinho, Tiago Marques, Rui Raimundo, Paulo Vieira, Alcobia, Paula, Elsa, Manuel, Carmo, Pedro Pereira, Pedro Salgueiro, Maria da Luz, Frederico Mestre, Sara, Rui Lourenço, Inês, Rosana, Lourenço, Pedro Carvalho, Manuela Correia e Joana Rosado.

Ao Prof. Alfredo Pereira por ter disponibilizado o espaço para a realização dos testes em cativeiro.

Por fim, gostaria também de agradecer aos meus orientadores, António Mira e Eduardo Barata por terem acreditado neste projeto, pelo seu apoio científico, pelas conversas, pelas reuniões, pelo interesse e disponibilidade.

Função das marcas odoríferas em *Microtus cabreræ*

(Thomas, 1906)

RESUMO

A marcação odorífera é uma forma de comunicação química levada a cabo por diversas espécies de animais terrestres, que implica a deposição de fezes, urina e/ou secreções anogenitais sobre o substrato. O objetivo principal desta tese é reconhecer a existência de marcação odorífera pelo rato de Cabrera e identificar as suas principais funções. Nesta espécie foram identificadas duas funções principais: (1) aumentar a probabilidade de encontrar um parceiro para acasalar, mostrando a sua disponibilidade e/ou proximidade a conspecíficos do sexo oposto; (2) alertar conspecíficos para o aumento de risco de predação num determinado local. Em ambas, as marcas de urina são as únicas envolvidas, não ocorrendo diferenças na marcação entre géneros. Ambos os sexos parecem estabelecer vínculo de casal, sendo que nestas condições, suprimem a marcação associada ao aumento da probabilidade de acasalamento, o que sugere uma elevada plasticidade intraespecífica do comportamento de marcação odorífera.

Function of scent-marks in *Microtus cabreræ* (Thomas, 1906)

ABSTRACT

Scent-marking is a form of chemical communication used by several terrestrial species that typically involve the deposition of faeces, urine and/or anogenital secretions on the substrate. The main goal of this thesis is to describe the use of scent-marking in Cabrera voles (*Microtus cabreræ*) and identify its main purposes. Two main scent-marking functions were identified: (1) increase mate-finding likelihood, by advertising its availability to mate and/or its presence in a nearby area; (2) alerting conspecifics of the increased predatory risk over a specific area. Only urine scent-marks were involved in both functions, and no differences were detected between genders. Both sex individuals seem to suppress mate-finding scent-marking when pair bonded with an opposite-sex conspecific, which suggests a relative high intraspecific plasticity of scent-marking behaviour.

Função das marcas odoríferas em *Microtus cabreræ*

(Thomas, 1906)

RESUMO ALARGADO

O rato de Cabrera (*Microtus cabreræ* Thomas, 1906) é um microtídeo raro, endémico da Península Ibérica, que se encontra ameaçado pela perda sistemática de habitat. A sua distribuição é bastante fragmentada, ocorrendo comumente em manchas desconexas e isoladas onde as densidades populacionais são extremamente baixas. Nestas condições, em que a probabilidade de encontro entre conspecíficos é relativamente reduzida, a comunicação mediante a marcação odorífera, que não implica a presença em simultâneo no mesmo espaço físico do emissor e do recetor, pode apresentar-se bastante vantajosa. Sendo o rato de Cabrera uma espécie sobre a qual ainda existe um grande desconhecimento, ignoram-se estudos sobre o seu comportamento de marcação odorífera. Este desconhecimento generalizado acerca da marcação odorífera nesta espécie justifica o conjunto de estudos que constituem a presente tese. Para além disto, suspeita-se que neste caso as funções subjacentes à marcação odorífera possam estar diretamente associadas à sua peculiar estrutura populacional, particularmente ao facto dos indivíduos estarem organizados em unidades populacionais discretas, com densidades extremamente baixas e relativamente isoladas entre si. Neste contexto, onde os encontros entre conspecíficos são bastante raros, algumas funções comumente atribuídas às marcas odoríferas noutras espécies de roedores (e.g. defesa do território e anúncio de presença a todos os conspecíficos) podem não ter tanta utilidade e, portanto,

não se verificar. Os objetivos desta tese são: (1) descrever a utilização da marcação odorífera no rato de Cabrera e determinar quais as suas características; (2) identificar quais são as suas principais funções; (3) investigar o efeito do vínculo de casal na marcação odorífera; (4) verificar a existência de feromonas de alarme nas marcas odoríferas do rato de Cabrera; (5) averiguar o seu efeito na atividade dos conspecíficos em habitat natural.

No primeiro artigo, estudou-se a marcação odorífera do rato de Cabrera sobre substrato limpo de forma a descrever a sua utilização por ambos os sexos. Analisou-se ainda a marcação odorífera sobre substratos previamente marcados por animais de cada sexo, de forma a inferir quais as suas principais funções. Com estes resultados foi possível testar a nossa hipótese de que a sua principal função é a de aumentar a probabilidade de encontrar um parceiro sexual. Considerou-se esta hipótese em função da estrutura pouco densa e altamente fragmentada das populações desta espécie, onde um dos fatores relevantes para a sua persistência pode ser a facilidade com que animais encontram um parceiro para acasalar. Apenas se verificou a marcação odorífera com fezes e urina, não sendo detetada a utilização de secreções anogenitais. Relativamente à quantidade e ao tipo de marcas colocadas no substrato, não foram detetadas diferenças de género. Ambos os sexos marcaram maior área com urina sobre substrato previamente marcado por animais do sexo oposto do que em substrato previamente marcados por animais do mesmo sexo ou substratos limpos, o que sustenta a nossa hipótese de que a sua principal função é aumentar a probabilidade de acasalamento. A urina parece ser o único tipo de marcas envolvida nesta função.

No segundo artigo, estudou-se o efeito do vínculo de casal na marcação odorífera e nas funções que lhes estão associadas. Um conjunto de evidências aponta para que nesta espécie os indivíduos de sexo oposto formem pares monogâmicos estabelecendo vínculo de casal entre si. O suposto estabelecimento desta afinidade afetará potencialmente a função associada à marcação odorífera, podendo ocorrer a supressão da marcação com a função de aumentar a probabilidade de acasalar. Para perceber os efeitos da coabitação em pares macho/fêmea na marcação odorífera comparou-se a marcação de substratos limpos por animais não emparelhados com a marcação dos mesmos indivíduos emparelhados com um conspecífico do sexo oposto. Analisou-se também a marcação odorífera de animais emparelhados sobre substratos previamente marcados por conspecíficos, de forma a perceber qual a função subjacente ao uso das marcas odoríferas nestas condições. O vínculo de casal não alterou a marcação odorífera de substratos limpos em ambos os sexos. No entanto o vínculo de casal parece ter suprimido a marcação odorífera cuja função parece ser a de aumentar a probabilidade de acasalamento.

No terceiro artigo, avaliou-se a presença de feromonas de alarme nas marcas odoríferas do rato de Cabrera, e os seus efeitos na atividade de conspecíficos. Sabe-se que várias espécies animais, quando sujeitas a situações de *stress*, libertam feromonas de alarme para o meio circundante, que ao serem detetadas por conspecíficos avisam para presença de um perigo iminente. Observações efetuadas durante sessões de captura de rato de Cabrera sugeriram a possibilidade da existência destas substâncias de alarme nas suas marcas odoríferas. Realizaram-se três testes para comprovar a libertação destas substâncias, nas marcas odoríferas, durante um evento de predação, a fim de perceber os seus efeitos na atividade dos conspecíficos. Inicialmente comparou-se a tipologia e

quantidade das marcas colocadas no substrato durante a simulação de um evento de predação, com as marcas colocadas numa situação de ausência de *stress*. Noutro ensaio, testou-se a preferência de animais de ambos os sexos por substratos com marcas produzidas durante a simulação de predação vs. substratos com marcas produzidas numa situação de ausência de *stress*. Por fim, analisaram-se os efeitos das marcas produzidas nestas duas condições na atividade de conspecíficos em meio natural, mediante o uso de radiotelemetria. Os resultados sugerem que a urina do rato de Cabrera produzida durante uma tentativa de predação contém informação de aviso capaz de ser detetada por conspecíficos alterando o seu comportamento, o que configura a existência de uma feromona de alarme. Em habitat natural, esta substancia reduz a atividade desses mesmos conspecíficos na proximidade das respetivas marcas. A libertação de tais substâncias em situações de predação é de elevada importância, principalmente porque permite avaliar o risco de predação num determinado local, levando à redução da atividade em locais cujo risco é mais elevado, o que reduzirá inerentemente a probabilidade de ser capturado.

Os resultados do conjunto dos estudos realizados permitem traçar diversas conclusões acerca da importância das marcas odoríferas para o rato de Cabrera: *i)* no rato de Cabrera, ao contrário de outro microtídeos as marcas de urina são as únicas que parecem estar envolvidas nas funções detetadas; *ii)* as marcas odoríferas têm um papel preponderante na regulação da atividade entre conspecíficos, mesmo em meio natural, onde os indivíduos estão sujeitos a uma multiplicidade de estímulos de diferentes origens; *iii)* as funções associadas às marcas odoríferas estudadas não estão dependentes do sexo do animal que produz a marca; *iv)* as marcas odoríferas parecem ter uma contribuição significativa para o *fitness* reprodutivo, pois tanto a marcação para

aumentar a probabilidade de encontrar um parceiro para acasalar como a marcação de alarme permitem ao rato de Cabrera assegurar descendência, incrementando ao mesmo tempo a sobrevivência da mesma; v) ao contrário de muitas espécies de roedores, inclusive de algumas congêneres suas, o rato de Cabrera não usa a marcação odorífera como estratégia de defesa do território ou como forma de avisar da sua passagem aos restantes conspecíficos. vi) as diferenças interespecíficas relativamente às funções das marcas odoríferas estão fortemente associadas à relação custo/benefício que propiciam, sendo a estrutura populacional uma condicionante relevante; vi) parece existir uma elevada plasticidade intraespecífica do comportamento de marcação odorífera nesta espécie, sendo que os animais modulam o seu comportamento de marcação de forma a reduzir os custos inerentes.

TERMINOLOGIA

Por uma questão de clareza e consistência, inclui-se uma pequena secção dedicada ao esclarecimento de alguns termos específicos que podem originar ambiguidades. Em função de muitos termos derivarem de terminologia em língua inglesa, a forma desta secção assemelha-se à de um glossário bilingue, onde se pode encontrar o termo em língua portuguesa, e em língua inglesa, seguidos de uma definição genérica dos mesmos. Para alguns termos achou-se conveniente fornecer informação adicional, sendo esta colocada após a definição do termo.

- » **Alelomonas** *Allelomones* Substâncias que transmitem informação entre organismos de diferentes espécies. Estas podem ser classificadas em três categorias conforme quem beneficiam: alomonas, cujos únicos beneficiados são os emissores do sinal (e.g. secreções tóxicas usadas para defesa); kairomonas, que são apenas vantajosas para os recetores do sinal; sinomonas, em que ambos os intervenientes na comunicação são beneficiados (Sbarbati and Osculati 2006).
- » **Contramarcacão** *Counter-marking* Colocação de marcas odoríferas próximas, sobrepostas ou não, a marcas previamente colocadas por um segundo indivíduo (Thomas and Kaczmarek 2002; Thomas and Wolff 2002; Wolff et al. 2002; Johnston 2003).
- » **Feromonas** *Pheromones* Semioquímicos utilizados na comunicação entre conspécíficos.
- » **Lipocalinas** *Lipocalins* É uma família de proteínas globulares que se ligam a outras moléculas de tamanhos e estruturas distintos, tal como feromonas voláteis, ácidos gordos, lípidos, esteroides, retinol e bilinas, funcionando como suas transportadoras.

- » **Marcação odorífera** *Scent-marking* Termo genérico para designar a colocação de semioquímicos sobre o substrato, ou estrutura nele existentes, com o intuito da comunicação .

- » **Proteínas urinárias principais** *Major urinary proteins* (MUP) Subfamília de lipocalinas, encontradas em abundância na urina e em diversas secreções animais.

- » **Semioquímicos** *Semiochemicals* Termo genérico para designar uma substância ou uma mistura de substâncias que é excretada, por um organismo, para o meio circundante evocando uma resposta comportamental ou fisiológica noutro organismo.

- » **Sistema vomeronasal** *Vomeronasal system* Sistema sensorial responsável pela deteção e reconhecimento de alguns semioquímicos, principalmente feromonas (Baxi et al. 2006; He et al. 2008; Rodriguez and Boehm 2009; Wysocki and Lepri 1991; Keverne 1999; Johnston 2003). Uma grande parte das feromonas conhecidas em vertebrados terrestres são detetadas por este sistema, levando alguns investigadores a considerar, erroneamente, que o sistema vomeronasal é especializado na deteção de feromonas, e o único capaz de o fazer (Baxi et al. 2006). O seu órgão principal é o órgão vomeronasal, sendo este uma estrutura alongada que se encontra ligada à cavidade nasal ou oral (consoante as espécies), por um canal, de forma a receber os estímulos químicos (Liman 1996).

- » **Sobremarcação** *Over-marking* Designa apenas a sobreposição parcial ou total das marcas odoríferas de um animal pelas marcas de um outro (Ferkin and Pierce 2007; Johnston 2003).

- » **Vínculo de casal** *Pair bonding* Vínculo ou forte afinidade que se estabelece entre os conspecíficos de sexo oposto que constituem um casal. Este tipo de ligação apenas parece estabelecer-se em espécies monogâmicas (Aragona and Wang 2004; Reichard and Boesch 2003).

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Resumo alargado	iv
Terminologia	ix
CAPÍTULO 1. Introdução Geral.....	1
1.1. Marcação odorífera	1
1.2. Marcação odorífera em roedores	6
1.2.1. Funções sociais associadas ao comportamento de marcação odorífera	8
1.2.2. Marcação odorífera e feromonas de alarme	12
1.3. Custos da marcação odorífera.....	15
1.4. Plasticidade intraespecífica do comportamento de marcação odorífera	17
1.5. O rato de Cabrera como espécie focal	19
1.5.1. Síntese da bio-ecologia.....	19
1.5.2. Marcação odorífera em rato de Cabrera	20
1.6. Objetivos e organização da tese.....	23
1.7. Referências.....	25
CAPÍTULO 2. O papel da marcação odorífera em populações extremamente fragmentadas de rato de Cabrera	48
CAPÍTULO 3. O efeito do vínculo de casal na marcação odorífera do rato de Cabrera	73
CAPÍTULO 4. Marcação de alarme durante tentativas de predação no rato de Cabrera	94

CAPÍTULO 5. Discussão Geral.....	123
5.1. Resumo dos principais resultados.....	124
5.1.1. O papel da marcação odorífera em populações extremamente fragmentadas de rato de Cabrera	124
5.1.2. O efeito do vínculo de casal na marcação odorífera do rato de Cabrera.	125
5.1.3. Marcação de alarme durante tentativas de predação no rato de Cabrera	126
5.2. Relevância dos resultados no panorama atual da marcação odorífera.....	127
5.3. Constrangimentos e investigação futura	130
5.4. Referências.....	134

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. MARCAÇÃO ODORÍFERA

A comunicação entre animais, nas suas diversas formas, é de extrema importância pois permite mediar as suas interações. Todos os animais precisam de informação acerca uns dos outros, como por exemplo o sexo, condição reprodutiva, a relação de parentesco, o estatuto social, identidade, e quais as suas “intenções”, de forma a reagir em conformidade para seu benefício. Toda a comunicação implica a passagem de informação de um emissor para um recetor por via de um sinal, podendo esta ser estabelecida através de pelo menos um dos diversos canais sensoriais. Os principais canais sensoriais usados para comunicação são o químico, o acústico, o visual e o táctil (Alcock 1989; Landete-Castillejos 1997; Espmark et al. 2000), sendo que a utilização de alguns destes canais em detrimento de outros está associado principalmente ao habitat da espécie e ao tipo de informação a ser enviada (Feldhamer 2007; Landete-Castillejos 1997).

Na comunicação química entre animais, a veiculação desta informação faz-se por via de substâncias químicas, os semioquímicos, que comumente são excretados para o meio circundante veiculando um sinal que ao ser detetado evoca uma resposta comportamental ou fisiológica específica (Mason et al. 2005). Os semioquímicos recebem diferentes designações consoante são usados na comunicação intraespecífica ou interespecífica. Estes designam-se feromonas quando usados para a comunicação

entre conspecíficos, e alelomonas quando usados na comunicação entre heterospecíficos (Sbarbati and Osculati 2006; Brennan and Zufall 2006; Burger 2005; Dehnhard 2011; Tirindelli et al. 2009).

As feromonas são de longe os semioquímicos mais estudados e parecem ser os mais abundantes na natureza. A grande maioria destas substâncias existe nos fluidos corporais como urina e suor, nas fezes, e na secreção de diferentes glândulas exócrinas (Wyatt 2003; Tirindelli et al. 2009). A sua detecção e reconhecimento está normalmente a cargo dos sistemas olfativos. Nos mamíferos, o sistema olfativo principal e o sistema vomeronasal são ambos responsáveis pela detecção de tais substâncias (Tirindelli et al. 2009; Baxi et al. 2006). Ambos se encontram localizados na cavidade nasal, e enquanto o sistema olfativo principal parece apenas ser capaz de detetar substâncias voláteis, o sistema vomeronasal é capaz de detetar igualmente substâncias voláteis e não voláteis (Liman 1996; Meredith 1998; Tirindelli et al. 2009; Baxi et al. 2006; Sam et al. 2001). Em função da natureza não volátil de determinados semioquímicos, a sua detecção pelo sistema vomeronasal está dependente da existência de algum de contacto físico com o estímulo químico para que este possa aceder ao epitélio sensorial, como por exemplo, mediante o auxílio da língua (Liman 1996; Tirindelli et al. 2009; Verberne 1976; Meredith 1998). Ainda no sistema vomeronasal a detecção de semioquímicos voláteis parece depender da existência de uma ligação entre estas pequenas moléculas e determinadas proteínas (e.g. afrodisina, proteína urinária principal) que atuam como transportadoras através do órgão vomeronasal até ao epitélio (Stopková et al. 2009).

As feromonas, tal como os restantes semioquímicos, podem ser libertadas diretamente para o ar ou depositadas sobre o substrato e/ou sobre outras estruturas existentes no

meio circundante (Johnson 1973). Esta ultima forma de comunicação química designa-se genericamente de “Marcação Odorífera”, sendo a forma de comunicação química mais ubíqua entre os mamíferos. A marcação odorífera envolve em grande parte dos casos a deposição de produtos de excreção, como urina e fezes (Ferkin and Johnston 1995; Eisenberg and Kleiman 1972; Arakawa et al. 2008; Brown and McDonald 1985). Os produtos de excreção contêm informação acerca do estado fisiológico de um individuo (Johnston et al. 1993), e numa perspetiva evolutiva, os animais recetores poderão ter desenvolvido a sua capacidade de detetar e interpretar a informação contida nesses sinais em seu benefício (Brown 1995). Consequentemente os emissores terão otimizado a estratégia de disseminação desses sinais de forma a fazê-los chegar a determinados conspecíficos com o menor custo energético possível. Pressupõem-se então, que estes sinais químicos poderão ter evoluído como sinais honestos acerca do estado de saúde e condição fisiológica do emissor do sinal, influenciando o comportamento e fisiologia dos seus conspecíficos (Gosling and Roberts 2001a; Penn and Potts 1998; Penn et al. 1998). Como exemplo, sabe-se que as substâncias odoríferas da urina de machos de diversas espécies de roedores (*Mus musculus*, *Microtus pensilvanicus*, *Microtus orchoagaster*) informam conspecíficos acerca do seu estado de saúde e relativamente ao seu quadro infeccioso, sendo que as fêmeas se mostram menos atraídas pelas marcas odoríferas de urina de machos infetados vs. machos não infetados (Penn and Potts 1998; Penn et al. 1998; Zala et al. 2004; Kavaliers and Colwell 1995b, a; Klein et al. 1999; Ehman and Scott 2001). Alguns aspetos na constituição e na colocação de certos produtos de excreção poderão ter evoluído para a comunicação, contudo a sua deposição numa qualquer circunstância não significa que esteja inerentemente a ser usado com essa função. Consequentemente, a expressão “marcação

odorífera” designa apenas as marcas usadas na comunicação entre indivíduos ou como suporte à orientação do próprio animal que as coloca.

A marcação odorífera pode ainda concretizar-se mediante a colocação de secreções provenientes de uma ou mais glândulas exócrinas (e.g. secreções anogenitais, secreções de diversas glândulas da pele) (Balakrishnan and Alexander 1976; Ferkin and Johnston 1995; Green 1987; Wolff et al. 2002; Thomas and Wolff 2002; Johnston 2003), que em alguns casos parecem ter evoluído especificamente para a produção de um determinado semioquímico (Johnston 2003; Johnston 1979; French and Snowdon 1981; Thiessen and Rice 1976; Eisenberg and Kleiman 1972). O uso de marcas odoríferas com diferentes proveniências pela mesma espécie é comum entre os mamíferos terrestres (Ferkin 2001; Johnston 2003). Os semioquímicos provenientes de origens distintas podem veicular diferentes informações, que sejam igualmente importantes na comunicação com os seus conspecíficos (Roberts 2007). Por exemplo, os hámsteres (*Mesocricetus auratus*) usam para a comunicação semioquímicos provenientes de seis diferentes origens, alguns dos quais veiculam diferentes tipos de informação (Johnston 2003). Da mesma forma, foi sugerido para os microtídeos (*Microtus* spp.) que o número de diferentes origens de semioquímicos usados na comunicação com conspecíficos do sexo oposto está relacionado com a quantidade e complexidade das informações a serem transmitidas (Ferkin 2001).

A marcação odorífera apresenta uma importante diferença relativamente a outras modalidades de comunicação química, de facto, ela permite que se estabeleça a comunicação mesmo sem a presença em simultâneo de ambos os intervenientes no mesmo espaço físico, ou seja sem que estes se encontrem (Gosling 1982). Isto só é

possível devido à elevada resiliência das marcas odoríferas (Johnston and Lee 1976; Fornasieri and Roeder 1992; Gosling and Roberts 2001a). As marcas odoríferas parecem manter-se ativas 7 dias numa espécie de antílope, *Oreotragus oreotragus* (Roberts 1998), 10 dias num mangusto, *Helogale undulata rufula* (Rasa 1973), 25 dias em *Microtus pensilvanicus* (Ferkin et al. 1995), pelo menos 30 dias numa hiena, *Hyena brunnea* (Gorman 1990), e 100 dias num hamster, *Mesocricetus auratus* (Johnston and Schmidt 1979). Sabendo-se ainda que a urina de machos dominantes de *Mus musculus* mantém o seu efeito sobre machos subordinados até 2 dias após a sua deposição (Jones and Nowell 1977), e que uma feromona presente na urina de fêmeas de *Mus domesticus* mantém sua atividade durante 30 dias (Sipos et al. 1993; Sipos et al. 1995).

A natureza química das substâncias existentes nas marcas odoríferas deverá ser a principal responsável pela sua enorme resiliência. A maioria das glândulas exócrinas existentes na pele dos mamíferos, e que participam na marcação odorífera, têm uma porção sebácea (Albone and Shirley 1984) que contribui para a secreção, principalmente, com moléculas lipídicas de grande massa molecular (Gorman et al. 1974). Outras secreções glandulares e produtos de excreção contêm moléculas proteicas, também de grande massa molecular, designadas genericamente como lipocalinas (e.g. afrodisina, proteína urinaria principal) (Hurst et al. 1998; Stopková et al. 2009; Henzel et al. 1988; Singer and Macrides 1990; Beynon and Hurst 2004). A inclusão generalizada de moléculas de maior massa molecular nas marcas odoríferas, relativamente a outras formas de comunicação química, resulta numa redução da volatilidade e no inerente aumento da persistência das marcas (Gosling and Roberts 2001b; Bossert and Wilson 1963; Alberts 1992). Sabe-se ainda que algumas proteínas, como as lipocalinas, ligam-se aos componentes voláteis existentes nas marcas, podendo

atuar como regulador da sua emissão (Stopková et al. 2009; Hurst et al. 1998; Brennan and Keverne 2004).

1.2. MARCAÇÃO ODORÍFERA EM ROEDORES

Em muitas das espécies de roedores o sentido do olfato é a fonte de informação mais relevante acerca do ambiente social e não social (Wyatt 2003), sendo a marcação odorífera abundantemente usada por roedores para comunicar, sobretudo com os seus conspecíficos (Johnston 2003; Roberts 2007). Nestes, tal como em outros mamíferos, a informação veiculada na marcação odorífera está intrinsecamente ligada a atividades imprescindíveis à sobrevivência da espécie, tal como a competição por recursos, atração e escolha do parceiro sexual (Roberts 2007). Nas marcas odoríferas existe informação variada acerca dos indivíduos que as depositaram, tal como género, sexo, identidade individual, estado reprodutivo, estado de saúde, estatuto, que os seus conspecíficos usam para regular o seu comportamento e interações futuras em proveito próprio ou de ambos (Bowers and Alexander 1967; Brown and McDonald 1985; Zala et al. 2004; Roberts 2007; Arakawa et al. 2008).

Conhecem-se inúmeras fontes de semioquímicos em roedores (Brown and McDonald 1985; Roberts 2007), no entanto, nem todas se sabe estarem envolvidas na marcação odorífera. A urina e as secreções anogenitais são as marcas mais comuns neste grupo taxonómico, sendo que algumas espécies usam também fezes e secreções de diversas glândulas exócrinas. Em *Mus musculus* spp., apesar da existência de diversas glândulas na face, a urina é a principal fonte de marcas odoríferas (Hurst 2005). Já em *Rattus*

norvegicus ambas marcas de urina e fezes parecem desempenhar um papel na comunicação entre conspecíficos (Landete-Castillejos 1997). Em *Acomys russatus*, as secreções orais são usadas para marcar os alimentos (Rozenfeld et al. 1994). Em dois dos microtídeos cujo comportamento de marcação odorífera foi mais exaustivamente estudado (*Microtus pensilvanicus*, *Microtus orchoagaster*), alguns autores identificaram o uso de fezes, urina e secreções anogenitais (Ferkin et al. 2001), outros apenas verificaram a marcação exclusiva com marcas de secreções anogenitais (Thomas and Wolff 2002; Wolff et al. 2002). A natureza química das substâncias usadas na marcação odorífera está estreitamente relacionada com a função a que se destina. Por exemplo, sabe-se que as feromonas usadas na atração sexual são as mais voláteis, de forma a atraírem um animal do sexo oposto durante o período em que o emissor está sexualmente ativo (Alberts 1992). Pelo contrário, as marcas para defesa do território são as menos voláteis de forma a permanecerem no ambiente durante um maior período de tempo maximizando a probabilidade de serem detetadas (Alberts 1992).

A deposição das marcas odoríferas envolve uma grande variedade de estratégias e comportamentos. Nos roedores, urinar, defecar e friccionar a zona anogenital sobre o substrato parecem ser os comportamentos mais comuns de aplicação das marcas odoríferas (Roberts 2007; Eisenberg and Kleiman 1972; Ferkin and Johnston 1995). Em termos espaciais, a sua colocação não é feita ao acaso. Por exemplo, é comum algumas espécies deixarem o maior número de marcas odoríferas junto dos limites do seu território como forma de defesa do mesmo (Gorman 1990; Gosling and Roberts 2001c), enquanto outras deixam as suas marcas ao longo dos trilhos como forma de orientação espacial, especialmente na procura de alimento (Jamon 1994; Galef and Buckley 1996; Lavenex and Schenk 1998). De facto, o tipo de marcas odoríferas, os locais onde são

depositadas e os padrões de marcação usados estão associados à função das marcas em causa, de forma a maximizar a eficácia das mesmas e a reduzir os custos inerentes ao comportamento de marcação (Gosling and Roberts 2001a; Gorman 1990; Gosling and Roberts 2001c; Alberts 1992).

1.2.1. FUNÇÕES SOCIAIS ASSOCIADAS AO COMPORTAMENTO DE MARCAÇÃO ODORÍFERA

Inúmeras funções têm sido atribuídas à marcação odorífera de roedores (Gosling 1982, 1990; Johnston 2003; Gosling and Roberts 2001c). De entre os exemplos encontra-se a hipótese destas marcas servirem para a orientação do próprio indivíduo no seu território (Jamon 1994; Galef and Buckley 1996; Lavenex and Schenk 1998), ou para a monitorização da utilização dos recursos alimentares disponíveis (Rozenfeld et al. 1994). Outras funções estão associadas à comunicação com heterospecíficos (Dobly et al. 2001; Rozenfeld et al. 1994). No entanto, a maioria dos estudos tem-se focado nas funções da marcação odorífera na comunicação entre conspecíficos, sendo nestas que os conhecimentos estão mais consolidados. Grande parte da informação veiculada entre roedores da mesma espécie, através das marcas odoríferas, está diretamente ou indiretamente relacionada com a mediação das relações individuais e, de uma forma mais global, com a manutenção dos seus sistemas sociais (Brennan and Kendrick 2006). De entre as diversas hipóteses avançadas para as funções sociais das marcas odoríferas, destacam-se duas hipóteses clássicas, sendo estas as mais comumente aceites entre as

inúmeras espécies de roedores estudadas: *i*) defesa do território, *ii*) aumento da probabilidade de consumir o acasalamento. De notar que estas funções não são mutuamente exclusivas, podendo estar associadas em simultâneo à marcação odorífera da mesma espécie (Ferkin et al. 2004b; Ferkin et al. 2001).

Nos roedores, de uma forma geral, a atividade está confinada a uma área específica, onde os animais podem encontrar grande parte dos recursos de que necessitam, e a qual defendem contra intrusos (Ostfeld 1990; Ostfeld 1985; Ims 1987). Este comportamento territorial visa principalmente proteger os recursos e/ou as suas crias, com as quais coabitam (Ostfeld 1990; Ostfeld 1985; Ims 1987; Wolff and Peterson 1998; Wolff 1993). A marcação odorífera envolvida na defesa territorial informa acerca da ocupação do território por um animal residente, e simultaneamente, demonstra a dominância deste sobre essa área (Ferkin 1999; Hurst and Beynon 2004; Gosling and Roberts 2001b). Os animais marcam abundantemente o seu território (Brown and McDonald 1985; Hurst 1990, 1987; Desjardins et al. 1973), ou pelo menos a sua periferia (Gorman 1990; Gosling and Roberts 2001c; Rich and Hurst 1999), informando os intrusos acerca da sua ocupação e da “propriedade” do mesmo (Humphries et al. 1999; Hurst 1990). De certa forma esta marcação intensiva do território é uma forma de demonstrar a sua capacidade competitiva, visto que apenas os animais em boas condições fisiológicas conseguem garantir que as suas marcas odoríferas predominem relativamente a outras marcas em todo o seu território (Hurst and Beynon 2004). Este estatuto de dominância sobre um território está dependente da capacidade de contramarcação ou sobremarcação imediata das marcas odoríferas dos intrusos, de forma a garantir que as suas marcas são também as mais recentes (Hurst 1993; Humphries et al. 1999; Rich and Hurst 1999). Assim, o uso da marcação odorífera para a defesa do território implica que o animal residente

esteja constantemente a patrulhá-lo à procura de marcas frescas provenientes de intrusos (Wilcox and Johnston 1995; Hurst and Rich 1999; Rich and Hurst 1999), o que envolve elevados custos energéticos. Adicionalmente, a inerente marcação contínua de áreas extensas (Brown and McDonald 1985; Hurst 1990; Humphries et al. 1999; Thomas and Wolff 2002; Johnston et al. 1994) envolve custos adicionais, tanto energéticos como os relacionados com aumento do risco de predação (Gosling et al. 2000; Mason et al. 2005; Koivula and Korpimäki 2001). No entanto, a marcação odorífera para a defesa territorial permite aos animais protegerem os seus recursos de forma menos onerosa quando comparada com uso do confronto físico. Tendo em conta que os animais que demonstram elevada capacidade competitiva são menos desafiados por parte dos intrusos (Smith and Parker 1976), a marcação odorífera permite evitar encontros agonísticos (Hurst and Beynon 2004; Lai and Johnston 2002; Jones and Nowell 1989; Hurst et al. 1994; Gosling 1982, 1990), os quais implicariam custos potencialmente elevados para os animais em causa, tais como lesões graves que comprometessem a própria sobrevivência.

Nos animais, uma grande parte da energia e do tempo é investida em estratégias para encontrar um parceiro sexual para acasalar. A marcação odorífera desempenha um papel de grande importância nestas estratégias ao veicular informação relevante entre conspecíficos de sexo oposto. Comumente, os animais direcionam o seu comportamento de marcação odorífera para os conspecíficos do sexo oposto, como forma a fazer chegar até estes informação acerca de si próprios, nomeadamente acerca do seu interesse e receptividade sexual (Ferkin et al. 2004a; Ferkin et al. 2004b; Ferkin et al. 2001; Ferkin and Pierce 2007), com o objetivo último da sua atração e consumação da cópula. Em diversas espécies, tanto machos como fêmeas, contramarcam ou sobremarcam as

marcas de conspecíficos do sexo oposto como forma de anunciar a sua presença e recetividade sexual (Ferkin et al. 2004a), maximizando assim as suas hipóteses de acasalamento. Adicionalmente, os machos ao colocarem marcas odoríferas junto das marcas das fêmeas aumentam a probabilidade de induzir o cio nas mesmas (Carter et al. 1987; Williams et al. 1992), garantindo a sua recetividade sexual enquanto estão nas imediações. No caso específico da sobremarcação, esta pode ainda estar envolvida na ocultação das marcas odoríferas dos potenciais parceiros sexuais, evitando que outros indivíduos potencialmente interessados em acasalar tomem conhecimento da sua ocorrência no local e tentem o acasalamento (Ferkin et al. 2004b; Woodward et al. 2000).

Diversos autores sustentam que algumas espécies de roedores usam a marcação odorífera para informar indiferenciadamente todos os seus conspecíficos da sua presença/passagem pelas zonas visitadas (Thomas and Kaczmarek 2002; Thomas and Wolff 2002; Wolff et al. 2002). A marcação odorífera com esta função implica a marcação sequencial de todas as áreas visitadas, sem que seja propositadamente direccionada apenas para alguns conspecíficos. O processo que confere benefícios significativos aos animais que usam esta forma de marcação odorífera não está cabalmente esclarecido (Roberts 2007), contudo parece estar associado à conservação da informação individual contida nas marcas depositadas. De facto, os animais que usam a marcação odorífera para anunciar a sua presença evitam marcar sobre as marcas odoríferas previamente colocadas por conspecíficos, maximizando o reconhecimento da informação individual existente nas marcas deixadas (Thomas and Kaczmarek 2002; Thomas and Wolff 2002). A marcação extensiva inerente ao anúncio da sua presença,

acarreta enormes custos, nomeadamente custos energéticos na produção dos semioquímicos envolvidos.

De forma geral o tipo de resposta que os animais de cada sexo desenvolvem perante as marcas de conspecíficos permite inferir quais as funções associadas à marcação odorífera (e.g. Johnston et al. 1993; Ferkin et al. 2001; Becker et al. 2012; Ferkin et al. 2004b). Por exemplo, quando um animal contramarca ou sobremarca as marcas odoríferas de um conspecífico do sexo oposto, muito provavelmente estará a usar a marcação odorífera para atração de um parceiro sexual (Ferkin et al. 2004b; Ferkin et al. 2001; Woodward et al. 2000). Em oposição, a colocação das suas marcas sobre ou perto das marcas de um conspecífico do mesmo sexo, estará usar a marcação odorífera para defesa territorial (Ferkin et al. 2004b; Ferkin et al. 2001).

1.2.2. MARCAÇÃO ODORÍFERA E FEROMONAS DE ALARME

Em muitas espécies os indivíduos emitem sinais de alarme em resposta a uma situação stressante, especialmente à presença de predadores (Caro 2005; Wyatt 2003; Hollén and Radford 2009). Alguns destes sinais parecem ser dirigidos para os próprios predadores, atuando diretamente como repelente ou atraindo outros predadores que ao interagirem com o primeiro proporcionam uma oportunidade de fuga (Chivers et al. 1996; Mathis et al. 1995; Smith 1992; Mathis and Smith 1993). Outros sinais de alarme parecem ser direcionados para conspecíficos com o objetivo de os avisar da existência de um perigo eminente, induzindo respostas anti predatórias que reduzem a probabilidade de serem capturados (Wyatt 2003; Caro 2005; Sherman 1985).

Os semioquímicos usados como sinal de alarme dirigidos a conspecíficos são designados de feromonas de alarme (Kikusui et al. 2001; Abel 1991; Abel and Bilitzke 1990; Cocke et al. 1993; Zalaquett and Thiessen 1991), e parecem estar relativamente difundidos no reino animal (Rottman and Snowdon 1972; Wilson 1975; Chen et al. 2006; Ackerl et al. 2002; Mathis and Smith 1993; Lawrence and Smith 1989; Brown et al. 2004; Moser et al. 1968; Blum 1969; Hews 1988; Hrbáček 1950; Halpern 1992). Em mamíferos, as feromonas de alarme foram encontradas em diversas espécies, como por exemplo, porcos domésticos (Vieuille-Thomas and Signoret 1992), gado bovino (Boissy et al. 1998), ratazanas (Abel 1991; Abel 1993; Abel and Bilitzke 1990; Hauser et al. 2008; Valenta and Rigby 1968; Kikusui et al. 2001; Mackaysim and Laing 1981) e ratos (Zalaquett and Thiessen 1991). Em algumas destas espécies, as feromonas de alarme, são libertadas sob a forma de marcas odoríferas, mais particularmente na urina (Vieuille-Thomas and Signoret 1992; Boissy et al. 1998; Mackaysim and Laing 1981; Gutierrez-Garcia et al. 2007; Kiyokawa et al. 2004).

As feromonas de alarme são libertadas na área onde ocorreu um evento stressante para o animal, e ao serem detetadas por conspecíficos induzem, geralmente, diversas respostas comportamentais que visam por exemplo a redução do risco de predação. Em roedores, as feromonas de alarme levam os conspecíficos a evitar as áreas marcadas (Mackay-Sim and Laing 1980; Rottman and Snowdon 1972; Carr et al. 1970; Zalaquett and Thiessen 1991), induzem a imobilidade (Kikusui et al. 2001; Hauser et al. 2005), e promovem a dissimulação e comportamentos de avaliação de risco predatório (Kiyokawa et al. 2006).

Na utilização de feromonas de alarme, os benefícios para os emissores do sinal não são de todo evidentes. De facto estes podem manifestar-se de diversas formas, por exemplo, sob a forma de *fitness* reprodutivo associado a aumento da probabilidade de sobrevivência da descendência (Frankham et al. 2010), ou de *fitness* inclusivo associado a sobrevivência de outros indivíduos aparentados (Mathis et al. 1995; Sherman 1977; Wu et al. 2010). Adicionalmente, ao salvar a vida de conspecíficos que ocorrem nas imediações, um animal pode estar a salvar a vida de um potencial parceiro sexual (Witkin and Fitkin 1979), de indivíduos que retribuirão no futuro (Ashton et al. 1998; Trivers 1971), ou de membros do seu grupo social em situações onde a vida em grupo é benéfica (Smith 1986).

A emissão de sinais de alarme é frequentemente associada á predação (Caro 2005), contudo os estudos realizados até à data em feromonas de alarme de mamíferos não permitem atestar tal associação. Existem duas limitações principais na utilização dos resultados destes estudos para inferir a utilização destas substâncias em mamíferos silvestres como resposta a eventos de predação. O primeiro é o facto da maioria destes estudos terem sido desenvolvidos em espécies domesticadas ou desenvolvidas para o trabalho laboratorial, tal como ratos Wistar (Kiyokawa et al. 2004; Kiyokawa et al. 2006; Gutierrez-Garcia et al. 2007; Hauser et al. 2008; Kikusui et al. 2001), ratos Sprague-Dawley (Abel 1993), ratos BALB/cJ (Zalaquett and Thiessen 1991), gado Aubrac (Boissy et al. 1998) e porcos domésticos (Vieuille-Thomas and Signoret 1992). Todos os processos artificiais de seleção, nos quais se inclui a domesticação, implicam alterações fisiológicas e comportamentais relativamente às espécies originais, sendo portanto pouco seguro inferir características comportamentais de espécies silvestres com base em informação obtida a partir destas espécies (Price 1999; Smith et al. 1994).

Segundo, os estímulos usados na maioria dos estudos para induzir o *stress* prossecutor da libertação das feromonas de alarme, são estímulos artificiais que não coincidem com estímulos associados a eventos predatórios que ocorrem na natureza (Gutierrez-Garcia et al. 2007; Mackay-Sim and Laing 1980; Kikusui et al. 2001; Abel 1993; Hauser et al. 2008). Esta situação leva a que se questione a capacidade dos eventos predatórios para induzir a libertação de feromonas de alarme, bem como a forma como tais substâncias influenciam os conspecíficos.

1.3. CUSTOS DA MARCAÇÃO ODORÍFERA

De forma geral, a marcação odorífera é uma atividade bastante dispendiosa para os animais que colocam as marcas. Os custos mais óbvios da marcação odorífera são os custos energéticos envolvidos na produção dos semioquímicos que constituem as marcas. A produção das secreções glandulares ou outras substâncias que compõem as marcas odoríferas pode acarretar um grande investimento energético (Roberts 2007). Por exemplo, as proteínas urinárias principais, comumente libertadas na urina de alguns roedores e cuja única função aparente é a comunicação (Nevison et al. 2003), são sintetizadas em grandes quantidades no fígado, com custos energéticos substancialmente elevados (Beynon et al. 2001). Obviamente, o custo energético da produção de semioquímicos é tanto maior quanto maior for a taxa de marcação levada a cabo por um animal. Além dos custos com a sintetização dos semioquímicos também o comportamento de colocação das marcas envolve custos energéticos, podendo ser mais ou menos significativos em função do comportamento de marcação. Por exemplo, nos

casos em que as marcas são colocadas numa grande extensão, e são recorrentemente “refrescadas”, os gastos energéticos associados ao comportamento de marcação odorífera deverão ser particularmente relevantes (Gosling et al. 2000). O dispêndio energético associado à marcação odorífera tem implicações para a condição fisiológica dos animais, sabendo-se por exemplo que em *Mus musculus* uma taxa de marcação odorífera mais elevada reduz a taxa de crescimento e a massa corporal (Gosling et al. 2000). Também o tempo despendido para a colocação das marcas pode implicar custos adicionais (Gosling 1986), isto porque inerentemente reduz o tempo disponível para outras atividades vitais como a aquisição de alimento e a reprodução.

Adicionalmente aos custos energéticos envolvidos na marcação, existem outros custos, igualmente elevados, que torna a marcação odorífera uma atividade bastante onerosa. Por exemplo, a interceção do sinal contido nas marcas odoríferas, por indivíduos que não os recetores a que se destinam, envolve muitas vezes custos significativos para os emissores do sinal (Roberts 2007). As fêmeas de *Mus domesticus* parecem usar a informação existente nas marcas odoríferas dos machos residentes para evitar o contacto, e provavelmente acasalamento, com machos de qualidade inferior (Rich and Hurst 1999). Também os machos intrusos usam esta informação para aceder à qualidade dos residentes, de forma a desafiar preferencialmente machos residentes de qualidade inferior (Rich and Hurst 1999). Para além dos conspecíficos, também os heterospecíficos podem intercetar a informação contida nas marcas odoríferas. As marcas odoríferas de roedores (e.g. *Microtus*, *Clethrionomys* e *Mus*) são detetadas por alguns dos seus predadores (Viitala et al. 1995; Koivula and Viitala 1999; Probst et al. 2002; Hughes et al. 2010; Ylönen et al. 2003), levando-os a focar o esforço de caça nas imediações das mesmas (Hughes et al. 2010; Koivula and Korpimäki 2001), o que

inerentemente aumenta significativamente o risco de predação para o emissor das marcas.

Os custos envolvidos na marcação odorífera estão claramente associados aos padrões de marcação e aos comportamentos envolvidos numa determinada função. Por exemplo, a utilização das marcas odorífera em funções, como a defesa territorial ou o anúncio indiferenciado da presença, que envolvem a marcação continuada de áreas extensas, muitas vezes de forma intensiva, incorre custos muito superiores (energéticos e risco predatório) aos de uma função que apenas envolva a marcação seletiva de áreas específicas como a levada a cabo para aumentar a probabilidade de acasalar.

1.4. PLASTICIDADE INTRAESPECÍFICA DO COMPORTAMENTO DE MARCAÇÃO ODORÍFERA

A marcação odorífera, com uma qualquer função, apenas ocorre enquanto confere aos emissores do sinal benefícios mais elevados que os custos globais envolvidos (Roberts and Gosling 2001; Gosling and Roberts 2001b; Roberts et al. 2001; Roberts 2012). Caso contrário a seleção atua contra a utilização das marcas odoríferas com essa função. No entanto, em situações específicas a seleção natural pode beneficiar a plasticidade do comportamento de marcação, levando à modulação da marcação odorífera entre diferentes condições dentro da mesma espécie (De Jong 2005; Padilla and Adolph 1996; Tienderen 1997; Moran 1992; Van Buskirk and Relyea 1998). A modulação do comportamento de marcação entre diferentes contextos permite reduzir os custos

quando a marcação odorífera não confere benefícios tão elevados (Whitman and Ananthakrishnan 2009; Ghalambor et al. 2007).

Nos mamíferos, existem diversos estudos que sugerem a plasticidade intraespecífica do comportamento de marcação odorífera. Por exemplo, as hienas (*Crocuta crocuta*) marcam a fronteira do território quando vivem em grupos que defendem territórios pequenos e ricos em alimento, pelo contrário quando vivem em grupos que defendem grandes territórios relativamente pobres em alimento, marcam apenas as áreas do território onde este existe em maior concentração (Gorman 1990). Outro exemplo de plasticidade do comportamento de marcação odorífera em mamíferos é o facto de machos dominantes de *Mus musculus* reduzirem significativamente a sua marcação territorial face ao aumento do risco de predação (Roberts et al. 2001).

Apenas um número bastante reduzido de estudos se focou na plasticidade intraespecífica do comportamento de marcação odorífera, relativamente à sua função, em diferentes contextos sociais (Becker et al. 2012; Le Roux et al. 2008). Por exemplo, numa espécie de mangusto africano (*Cynictis penicillata*) a densidade populacional influencia a intensidade de marcação territorial levada a cabo por machos subordinados, sendo esta bastante intensa em populações com densidades relativamente elevadas, e quase ausente em populações com baixas densidades (Le Roux et al. 2008). Outro estudo, mostrou que numa espécie estritamente monogâmica de roedor (*Peromyscus californicus*), que o estabelecimento de um vínculo entre os membros do casal influencia a marcação odorífera do macho, que reduz a marcação odorífera direccionada a fêmeas desconhecidas, sugerindo a supressão da marcação odorífera para fins de obtenção de um parceiro sexual (Becker et al. 2012).

1.5. O RATO DE CABRERA COMO ESPÉCIE FOCAL

1.5.1. SÍNTESE DA BIO-ECOLOGIA

O rato de Cabrera é um microtídeo raro e endêmico da Península Ibérica (Mira et al. 2008). É considerado especialista em termos de habitat, ocorrendo associado a zonas húmidas, com cobertura herbácea perene e alta (Fernandez-Salvador 1998; Landete-Castillejos et al. 2000; Pita et al. 2007; Pita et al. 2006; Santos et al. 2005; Santos et al. 2006), habitat relativamente raro e marginal que ocorre frequentemente em pequenas parcelas isoladas e extremamente dispersas (Pita et al. 2006). As suas populações são espacialmente estruturadas (i.e. metapopulações), caracterizando-se pelas densidades extremamente baixas, e por se apresentarem bastante fragmentadas (Mira et al. 2008; Pita et al. 2007; Pita et al. 2006; Palomo and Gisbert 2002). Na literatura, as densidades para as populações do rato de Cabrera variam entre 115 ind/ha (Fernandez-Salvador et al. 2005) e 250 ind/ha (Landete-Castillejos et al. 2000), no entanto estes valores estarão sobrestimados visto que a metodologia usada para as estimativas não teve em conta a distribuição fragmentada desta espécie. Usando modelos espacialmente explícitos de captura-recaptura adequados à estimação de densidades em populações espacialmente fragmentadas, as estimativas preliminares para a densidade das populações do rato de Cabrera no Sul de Portugal são de cerca 8 ind/ha (Ricardo Pita dados não publicados).

Esta espécie é considerada uma espécie com estratégia reprodutiva tipo K (Fernandez-Salvador et al. 2001; Ventura et al. 1998; Fernandez-Salvador 1998), na qual os indivíduos se apresentam organizados em casais monogâmicos, com um período

relativamente alto de coresidência (aprox. 10 meses), durante o qual os machos partilham o ninho com as fêmeas e crias, colaborando nos cuidados parentais (Fernandez-Salvador et al. 2001; Fernandez-Salvador 1998; Fernandez-Salvador et al. 2005). Esta evidência, associada ao reduzido dimorfismo sexual nas dimensões corporais (Ventura et al. 1998), às relativamente pequenas dimensões dos testículos nos machos adultos (Ventura et al. 1998), à reduzida variação intersexual da dimensão das áreas de atividade (Pita et al. 2010), e à sua enorme sobreposição entre animais de ambos os sexos (Pita et al. 2010), sugere que o rato de Cabrera estabelece o vínculo de casal entre indivíduos de ambos os sexos.

1.5.2. MARCAÇÃO ODORÍFERA EM RATO DE CABRERA

A característica mais peculiar das populações do rato de Cabrera é, como se referiu atrás, o facto de serem extremamente fragmentadas e, aparentemente, com densidades populacionais bastante reduzidas (Mira et al. 2008; Pita et al. 2007; Pita et al. 2006, 2010; Pita et al. 2011). Nestas condições, onde a probabilidade de encontro entre conspecíficos é relativamente baixa, a marcação odorífera poderá ter um valor acrescentado na veiculação da informação entre conspecíficos. De facto, a elevada resiliência das marcas odoríferas permite aos animais difundirem informação numa determinada área por um longo período de tempo, proporcionando uma maior probabilidade de receção da mensagem pelos conspecíficos, relativamente a outras formas de comunicação. Adicionalmente, sendo o rato de Cabrera uma espécie com constrangimentos distintos das espécies generalistas, nas quais a marcação odorífera foi

mais extensivamente estudada, é de supor que marcação odorífera possa servir funções igualmente distintas. Todavia, não existem estudos acerca da marcação odorífera no rato de Cabrera, desconhecendo-se igualmente estudos acerca da marcação odorífera em espécies de roedores que partilhem características populacionais similares. Pode então considerar-se que a informação acerca da marcação odorífera de espécies de roedores em condições de extrema fragmentação, associada a densidades populacionais baixas é virtualmente inexistente.

Em espécies generalistas, onde a competição intrasexual é mais intensa como resultado dos indivíduos ocuparem territórios contíguos e/ou possuírem áreas de atividade relativamente grandes, o uso da marcação odorífera com funções como a defesa do território e o anúncio indiferenciado de presença, parece conferir benefícios evidentes (Ferkin et al. 2004b; Thomas and Wolff 2002; Wolff et al. 2002; Hurst and Beynon 2004; Getz et al. 2005; Madison and Mcshea 1987; Getz and Carter 1996). Nestas condições, a probabilidade dos conspecíficos se encontrarem é relativamente alta proporcionando um meio social mais complexo, onde a marcação odorífera poderá desempenhar um papel fundamental como mediador social (Hurst and Beynon 2004; Gosling 1982, 1990). No entanto, como já se referiu anteriormente, os custos associados aos padrões de marcação odorífera inerentes a estas duas funções, são bastante elevados. Em espécies cujas populações se apresentem extremamente fragmentadas e com baixas densidades, onde a frequência de encontro entre conspecíficos e a competição intrasexual são relativamente reduzidas, os benefícios proporcionados por estas funções poderão ser insuficientes para justificar os custos. Por outro lado, um dos maiores constrangimentos enfrentados pelos indivíduos neste tipo de populações é a dificuldade em encontrar parceiro sexual (Courchamp et al. 2009; Courchamp et al. 1999; Stephens

and Sutherland 1999). A marcação odorífera para aumentar a probabilidade de acasalar poderá conferir benefícios significativos nesta situação. Em função do exposto, é possível que o rato de Cabrera use a marcação odorífera para anunciar a sua presença ao sexo oposto e assim aumentar a probabilidade de acasalamento.

Em espécies monogâmicas, o uso da marcação odorífera para aumentar a probabilidade de acasalamento é vantajoso apenas para os animais que estejam à procura de parceiro sexual. Contudo, em algumas destas espécies, entre as quais parece estar o rato de Cabrera, os animais de sexo oposto formam um par estável, estabelecendo entre si um vínculo de casal, onde raramente ocorre o acasalamento fora do par (Aragona and Wang 2004). Nestas condições específicas, dado os custos elevados da marcação odorífera (energéticos e risco de predação; (Gosling et al. 2000; Mason et al. 2005; Koivula and Korpimäki 2001) é possível que os animais que estabeleçam o vínculo de casal suprimam esta forma de marcação odorífera para reduzir os custos envolvidos.

No rato de Cabrera, espécie que aparentemente ocorre em pequenos grupos familiares, compostos provavelmente por um casal de progenitores e suas crias, que ocupam pequenas parcelas de habitat extremamente dispersas sobre uma matriz inóspita, a pressão predatória prevê-se bastante elevada (Pita et al. 2007; Pita et al. 2006). Nestas condições, a libertação de feromonas de alarme, direcionadas aos conspecíficos, durante um evento predatório conferiria benefícios bastante significativos. De facto, existem zonas onde as características do habitat, como a densidade e altura da cobertura vegetal, a proximidade a áreas de atividade de predadores, favorecem o sucesso de caça dos predadores, propiciando um elevado risco de predação (Andersson et al. 2009; Carlson 1985; Malan and Crowe 1997; Widén 1994). A colocação de marcas odoríferas com

feromonas de alarme numa zona onde ocorrera um evento predatório, logo com risco predatório potencialmente elevado, levaria os seus conspecíficos a evitar estas áreas ou nelas desenvolverem respostas anti-predatórias que reduziriam a probabilidade de captura. Algumas observações realizadas durante inúmeras sessões de armadilhagem do rato de Cabrera, como por exemplo, o evitar das armadilhas onde outro animal havia sido capturado anteriormente, sugeriram a possibilidade da existência de feromonas de alarme nas marcas odoríferas desta espécie.

1.6. OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese centra-se no estudo do comportamento de marcação odorífera do rato de Cabrera e das suas funções. De facto, o desconhecimento generalizado acerca da existência de marcação odorífera nesta espécie, das suas características e das suas funções foi o que inicialmente incentivou a realização desta tese. Adicionalmente, as peculiaridades inerentes à ecologia do rato de Cabrera, nomeadamente a sua distribuição altamente fragmentada e as baixas densidades populacionais, potenciam as suspeitas da existência de diferenças no comportamento de marcação odorífera relativamente a espécies evolutivamente próximas. Sendo a marcação odorífera uma atividade bastante dispendiosa, alguns dos padrões de marcação odorífera associados à generalidade das espécies de roedores poderão, nesta espécie e nestas condições, não assegurar benefícios suficientes para justificar a sua seleção pelas dinâmicas evolutivas. Por outro lado, a

marcação odorífera associada a outras funções, ainda pouco exploradas em animais silvestres, podem conferir enormes vantagens.

Esta tese pretende responder às seguintes questões específicas:

- 1) Há evidências de marcação odorífera com funções sociais no rato de Cabrera?**
- 2) Quais as características da marcação odorífera do rato de Cabrera?
Existe dimorfismo sexual relativamente ao seu comportamento de marcação?**
- 3) Quais as principais funções sociais da marcação odorífera do rato de Cabrera?**
- 4) Quais os efeitos do vínculo de casal na marcação odorífera do rato de Cabrera?**
- 5) O rato de Cabrera liberta feromonas de alarme nas suas marcas odoríferas quando sujeito a estímulos predatórios?**
- 6) Quais os efeitos destas substâncias de alarme na atividade de conspecíficos no seu habitat natural?**

Para além da introdução, onde é feita uma revisão acerca dos assuntos principais e objetivos subjacentes a esta pesquisa, a presente dissertação compreende 3 capítulos de resultados, sendo que cada um consiste num artigo científico aceite ou submetido para publicação numa revista internacional com revisão por pares. No primeiro, o capítulo 2, estudou-se a ocorrência de marcação odorífera no rato de Cabrera e testaram-se quais as suas funções sociais, dando resposta as questões 1, 2 e 3. No capítulo 3 abordou-se a plasticidade intraespecífica do comportamento de marcação odorífera associada ao vínculo de casal (questão 4). No capítulo 4, avaliou-se a possível libertação de feromonas de alarme na marcação odorífera desta espécie quando sujeita a tentativas de predação, e os seus efeitos em conspecíficos (questões 5 e 6). Por fim, no capítulo 5 apresenta-se um resumo dos principais resultados e conclusões desta pesquisa.

1.7. REFERÊNCIAS

- Abel EL (1991) Alarm substance emitted by rats in the forced-swim test is a low volatile pheromone. *Physiol Behav* 50 (4):723-727. doi:10.1016/0031-9384(91)90009-d
- Abel EL (1993) Physiological-effects of alarm chemosignal emitted during the forced swim test. *J Chem Ecol* 19 (12):2891-2901
- Abel EL, Bilitzke PJ (1990) A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiol Behav* 48 (2):233-239

- Ackerl K, Atzmueller M, Grammer K (2002) The scent of fear. *Neuroendocrinol Lett* 23 (2):79-84
- Alberts AC (1992) Constraints on the Design of Chemical Communication Systems in Terrestrial Vertebrates. *The American Naturalist* 139 (Supplement: Sensory Drive. Does Sensory Drive Biology Bias or Constrain the Direction of Evolution?):S62-S89
- Albone ES, Shirley SG (1984) *Mammalian semiochemistry: the investigation of chemical signals between mammals*. Wiley,
- Alcock J (1989) *Animal Behavior: an Evolutionary Approach*. 4th edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Andersson M, Wallander J, Isaksson D (2009) Predator perches: a visual search perspective. *Funct Ecol* 23 (2):373-379. doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01512.x
- Aragona BJ, Wang Z (2004) The prairie vole (*Microtus ochrogaster*): an animal model for behavioral neuroendocrine research on pair bonding. *Ilar J* 45 (1):35-45
- Arakawa H, Blanchard DC, Arakawa K, Dunlap C, Blanchard RJ (2008) Scent marking behavior as an odorant communication in mice. *Neurosci Biobehav R* 32 (7):1236-1248. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.05.012
- Ashton MC, Paunonen SV, Helmes E, Jackson DN (1998) Kin altruism, reciprocal altruism, and the big five personality factors. *Evol Hum Behav* 19 (4):243-255. doi:10.1016/s1090-5138(98)00009-9
- Balakrishnan M, Alexander KM (1976) Hormonal control of scent marking in the Indian musk shrew, *Suncus murinus viridescens* (Blyth). *Horm Behav* 7 (4):431-439. doi:10.1016/0018-506x(76)90014-3

- Baxi KN, Dorries KM, Eisthen HL (2006) Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones? *Trends Neurosci* 29 (1):1-7. doi:10.1016/j.tins.2005.10.002
- Becker EA, Petrino S, Marler CA (2012) A comparison of scent marking between a monogamous and promiscuous Species of *Peromyscus*: pair bonded males do not advertise to novel females. *Plos One* 7 (2):e32002. doi:10.1371/journal.pone.0032002
- Beynon R, Hurst J, Gaskell S, Hubbard S, Humphries R, Malone N, Marie A, Martinsen L, Nevison C, Payne C, Robertson DL, Veggerby C (2001) Mice, Mups and Myths: Structure-Function Relationships of the Major Urinary Proteins. In: Marchlewska-Koj A, Lepri J, Müller-Schwarze D (eds) *Chemical Signals in Vertebrates 9*. Springer US, pp 149-156. doi:10.1007/978-1-4615-0671-3_19
- Beynon RJ, Hurst JL (2004) Urinary proteins and the modulation of chemical scents in mice and rats. *Peptides* 25 (9):1553-1563
- Blum MS (1969) Alarm Pheromones. *Annu Rev Entomol* 14 (1):57-80. doi:doi:10.1146/annurev.en.14.010169.000421
- Boissy A, Terlouw C, Le Neindre P (1998) Presence of cues from stressed conspecifics increases reactivity to aversive events in cattle: evidence for the existence of alarm substances in urine. *Physiol Behav* 63 (4):489-495
- Bossert WH, Wilson EO (1963) The analysis of olfactory communication among animals. *J Theor Biol* 5 (3):443-469
- Bowers JM, Alexander BK (1967) Mice: individual recognition by olfactory cues. *Science* 158 (3805):1208-1210

- Brennan PA, Kendrick KM (2006) Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philos T R Soc B* 361 (1476):2061-2078. doi:10.1098/rstb.2006.1931
- Brennan PA, Keverne EB (2004) Something in the Air? New Insights into Mammalian Pheromones. *Curr Biol* 14:81-89
- Brennan PA, Zufall F (2006) Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 444 (7117):308-315
- Brown GE, Poirier J, Adrian JC (2004) Assessment of local predation risk: the role of subthreshold concentrations of chemical alarm cues. *Behav Ecol* 15 (5):810-815. doi:10.1093/beheco/arh084
- Brown RE (1995) What is the role of the immune system in determining individually distinct body odours? *Int J Immunopharmacol* 17 (8):655-661. doi:10.1016/0192-0561(95)00052-4
- Brown RE, McDonald DW (1985) Social odours in mammals, vol 1 & 2. Brown, R. E. McDonald, D. W. edn. Clarendon Press, Oxford
- Burger B (2005) Mammalian Semiochemicals. In: Schulz S (ed) *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II*, vol 240. *Topics in Current Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, pp 231-278. doi:10.1007/b98318
- Carlson A (1985) Prey detection in the red-backed shrike (*Lanius collurio*): an experimental study. *Anim Behav* 33 (4):1243-1249. doi:10.1016/s0003-3472(85)80184-6
- Caro T (2005) Antipredator defenses in birds and mammals. University of Chicago Press,
- Carr WJ, Martorano RD, Krames L (1970) Responses of mice to odors associated with stress. *J Comp Physiol Psych* 71 (2, Part 1):223-228. doi:10.1037/h0029164

- Carter CS, Witt DM, Schneider J, Harris ZL, Volkening D (1987) Male stimuli are necessary for female sexual behavior and uterine growth in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Horm Behav* 21 (1):74-82. doi:10.1016/0018-506x(87)90032-8
- Chen D, Katdare A, Lucas N (2006) Chemosignals of fear enhance cognitive performance in humans. *Chem Senses* 31 (5):415-423. doi:10.1093/chemse/bjj046
- Chivers DP, Brown GE, Smith RJF (1996) The evolution of chemical alarm signals: Attracting predators benefits alarm signal senders. *Am Nat* 148:649-659
- Cocke R, Moynihan JA, Cohen N, Grota LJ, Ader R (1993) Exposure to conspecific alarm chemosignals alters immune-responses in balb/c mice. *Brain Behav Immun* 7 (1):36-46
- Courchamp F, Berec L, Gascoigne J (2009) *Allee effects in ecology and conservation*. Oxford University Press,
- Courchamp F, Clutton-Brock T, Grenfell B (1999) Inverse density dependence and the Allee effect. *Trends Ecol Evol* 14 (10):405-410
- De Jong G (2005) Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytol* 166 (1):101-118. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01322.x
- Dehnhard M (2011) Mammal semiochemicals: understanding pheromones and signature mixtures for better zoo-animal husbandry and conservation. *Int Zoo Yearbook* 45 (1):55-79. doi:10.1111/j.1748-1090.2010.00131.x
- Desjardins C, Maruniak JA, Bronson FH (1973) Social rank in house mice: differentiation revealed by ultraviolet visualization of urinary marking patterns. *Science* 182 (4115):939-941

- Dobly A, Rozenfeld FM, Haim A (2001) Effect of congeneric chemical signals of different ages on foraging response and food choice in the field by golden spiny mice (*Acomys russatus*). J Chem Ecol 27 (10):1953-1961
- Ehman KD, Scott ME (2001) Urinary odour preferences of MHC congenic female mice, *Mus domesticus*: implications for kin recognition and detection of parasitized males. Anim Behav 62 (4):781-789. doi:10.1006/anbe.2001.1805
- Eisenberg JF, Kleiman DG (1972) Olfactory communication in mammals. Annu Rev Ecol Syst 3:1-32
- Espmark Y, Amundsen T, Rosenqvist G, Selskab KNV (2000) Animal Signals: Signalling and Signal Design in Animal Communication. Tapir Academic Press, Trondheim, Norway
- Feldhamer GA (2007) Mammalogy: Adaptation, Diversity, Ecology. JHU Press,
- Ferkin M (1999) Over-marking and adjacent-marking may be used as competitive tactics during odor communication in voles. In: Johnston RE, Muller-Schwarze D, Sorenson PW (eds) Advances in chemical signals in vertebrates, vol 8. Plenum, New York, pp 239-246
- Ferkin MH (2001) Patterns of sexually distinct scents in *Microtus spp.* Can J Zool 79 (9):1621-1625
- Ferkin MH, Burda J, O'Connor MP, Lee CJ (1995) Persistence of the attractiveness of two sex-specific scents in meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. Ethology 101 (3):228-238. doi:10.1111/j.1439-0310.1995.tb00361.x
- Ferkin MH, Johnston RE (1995) Meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, use multiple sources of scent for sex recognition. Anim Behav 49 (1):37-44

- Ferkin MH, Lee DN, Leonard ST (2004a) The reproductive state of female voles affects their scent marking behavior and the responses of male conspecifics to such marks. *Ethology* 110 (4):257-272
- Ferkin MH, Li HZ, Leonard ST (2004b) Meadow voles and prairie voles differ in the percentage of conspecific marks they over-mark. *Acta Ethol* 7 (1):1-7
- Ferkin MH, Mech SG, Paz-Y-Mino G (2001) Scent marking in meadow voles and prairie voles: a test of three hypotheses. *Behaviour* 138:1319-1336
- Ferkin MH, Pierce AA (2007) Perspectives on over-marking: is it good to be on top? *J Ethol* 25 (2):107-116
- Fernandez-Salvador R (1998) Topillo de cabrera, *Microtus cabreræ* Thomas, 1906. *Galemys* 10 (2):5-18
- Fernandez-Salvador R, Garcia-Perea R, Ventura J (2001) Reproduction and postnatal growth of the cabrera vole, *Microtus cabreræ*, in captivity. *Can J Zool* 79 (11):2080-2085
- Fernandez-Salvador R, Ventura J, Garcia-Perea R (2005) Breeding patterns and demography of a population of the cabrera vole, *Microtus cabreræ*. *Anim Biol* 55 (2):147-161
- Fornasieri I, Roeder JJ (1992) Behavioral responses to own and other species scent marks in *Lemur fulvus* and *Lemur macaco*. *J Chem Ecol* 18 (11):2069-2082. doi:10.1007/bf00981928
- Frankham R, Ballou JJD, Briscoe DDA (2010) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press,
- French JA, Snowdon CT (1981) Sexual dimorphism in responses to unfamiliar intruders in the tamarin, *Saguinus oedipus*. *Anim Behav* 29 (3):822-829. doi:10.1016/s0003-3472(81)80016-4

- Galef BG, Buckley LL (1996) Use of foraging trails by Norway rats. *Anim Behav* 51 (4):765-771
- Getz LL, Carter CS (1996) Prairie vole partnerships. *Am Sci* 84 (56-62)
- Getz LL, McGuire B, Carter CS (2005) Social organization and mating system of free-living prairie voles *Microtus ochrogaster*: a review. *Acta Zool Sinica* 51 (2):178-186
- Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct Ecol* 21 (3):394-407. doi:10.1111/j.1365-2435.2007.01283.x
- Gorman M, Nedwell DB, Smith RM (1974) An analysis of the contents of the anal scent pockets of *Herpestes auropunctatus* (Carnivora: Viverridae). *J Zool* 172 (3):389-399. doi:10.1111/j.1469-7998.1974.tb04115.x
- Gorman ML (1990) Scent marking strategies in mammals. *Rev Suisse Zool* 97
- Gosling LM (1982) A reassessment of the function of scent marking in territories. *Z Tierpsychol* 60 (2):89-118
- Gosling LM (1986) Economic Consequences of Scent Marking in Mammalian Territoriality. In: Duvall D, Müller-Schwarze D, Silverstein R (eds) *Chemical Signals in Vertebrates 4*. Springer US, pp 385-395. doi:10.1007/978-1-4613-2235-1_28
- Gosling LM (1990) Scent-marking by resource holders: alternative mechanisms for advertising the costs of competition. In: MacDonald DW, Müller-Schwarze D, Natynczuk SE (eds) *Chemical Signals in Vertebrates*, vol 5. Oxford Univ. Press, Oxford, p 315—328

- Gosling LM, Roberts SC (2001a) Scent-marking by male mammals: Cheat-proof signals to competitors and mates. In: Peter J. B. Slater JSRCTS, Timothy JR (eds) *Advances in the Study of Behavior*, vol Volume 30. Academic Press, pp 169-217
- Gosling LM, Roberts SC (2001b) Scent-marking by male mammals: Cheat-proof signals to competitors and mates. In: *Advances in the Study of Behavior*, Vol 30, vol 30. *Advances in the Study of Behavior*. Academic Press Inc, San Diego, pp 169-217
- Gosling LM, Roberts SC (2001c) Testing ideas about the function of scent marks in territories from spatial patterns. *Anim Behav* 62 (3):F7-F10
- Gosling LM, Roberts SC, Thornton EA, Andrew MJ (2000) Life history costs of olfactory status signalling in mice. *Behav Ecol Sociobiol* 48 (4):328-332
- Green MJB (1987) Scent-marking in the Himalayan musk deer (*Moschus chrysogaster*), vol 1. vol 4.
- Gutierrez-Garcia AG, Contreras CM, Mendoza-Lopez MR, Garcia-Barradas O, Cruz-Sanchez S (2007) Urine from stressed rats increases immobility in receptor rats forced to swim: Role of 2-heptanone. *Physiol Behav* 91 (1):166-172
- Halpern M (1992) Nasal chemical senses in reptiles: structure and function. In: Gans C, Crews D (eds) *Biology of the reptilia, physiology, hormones, brain and behavior*, vol 18. 2nd edn. University of Chicago Press, Chicago pp 423-523
- Hauser R, Marczak M, Karaszewski B, Wiergowski M, Kaliszan M, Penkowski M, Kernbach-Wighton G, Jankowski Z, Namiesnik J (2008) A preliminary study for identifying olfactory markers of fear in the rat. *Lab Anim* 37 (2):76-80

- Hauser R, Wierowski M, Marczak M, Karaszewski B, Wodniak-Ochocinska L (2005) Alarm pheromones as an exponent of emotional state shortly before death - Science fiction or a new challenge? *Forensic SciInt* 155 (2-3):226-230
- He J, Ma L, Kim S, Nakai J, Yu CR (2008) Encoding Gender and Individual Information in the Mouse Vomeronasal Organ. *Science* 320 (5875):535-538. doi:10.1126/science.1154476
- Henzel WJ, Rodriguez H, Singer AG, Stults JT, Macrides F, Agosta WC, Niall H (1988) The primary structure of aphrodisin. *J Biol Chem* 263 (32):16682-16687
- Hews DK (1988) Alarm response in larval western toads, *Bufo boreas*: release of larval chemicals by a natural predator and its effect on predator capture efficiency. *Anim Behav* 36 (1):125-133. doi:10.1016/s0003-3472(88)80255-0
- Hollén LI, Radford AN (2009) The development of alarm call behaviour in mammals and birds. *Anim Behav* 78 (4):791-800. doi:10.1016/j.anbehav.2009.07.021
- Hrbáček J (1950) On the flight reaction of tadpoles of the common toad caused by chemical substances. *Cell Mol Life Sci* 6 (3):100-102. doi:10.1007/bf02153372
- Hughes NK, Price CJ, Banks PB (2010) Predators are attracted to the olfactory signals of prey. *Plos One* 5 (9):e13114. doi:10.1371/journal.pone.0013114
- Humphries RE, Robertson DHL, Beynon RJ, Hurst JL (1999) Unravelling the chemical basis of competitive scent marking in house mice. *Anim Behav* 58:1177-1190
- Hurst J (2005) Making sense of scents: reducing aggression and uncontrolled variation in laboratory mice. *Mouse scents and optimal husbandry* 2
- Hurst J, Rich TJ (1999) Scent marks as competitive signals of mate quality. In: Johnson RE, Muller-Schwarze D, Sorensen P (eds) *Advances in Chemical Communication in Vertebrates*. Plenum Press, New York, pp 209-226

- Hurst JL (1987) The functions of urine marking in a free-living population of house mice, *Mus-Domesticus* Ratty. Anim Behav 35:1433-1442
- Hurst JL (1990) Urine marking in populations of wild house mice *Mus-Domesticus* Ratty .1. communication between males. Anim Behav 40:209-222
- Hurst JL (1993) The priming effects of urine substrate marks on interactions between male house mice, *Mus Musculus-Domesticus* Schwarz and Schwarz. Anim Behav 45 (1):55-81
- Hurst JL, Beynon RJ (2004) Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. Bioessays 26 (12):1288-1298
- Hurst JL, Hayden L, Kingston M, Luck R, Sorensen K (1994) Response of the aboriginal house mouse *Mus spretus* Lataste to tunnels bearing the odours of conspecifics. Anim Behav 48 (5):1219-1229. doi:http://dx.doi.org/10.1006/anbe.1994.1354
- Hurst JL, Robertson DHL, Tolladay U, Beynon RJ (1998) Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals. Anim Behav 55:1289-1297
- Ims RA (1987) Male Spacing Systems in Microtine Rodents. The American Naturalist 130 (4):475-484
- Jamon M (1994) An analysis of trail-following behaviour in the wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. Anim Behav 47 (5):1127-1134. doi:http://dx.doi.org/10.1006/anbe.1994.1151
- Johnson RE (1973) Scent marking in mammals. Anim Behav 21 (3):521-535. doi:10.1016/s0003-3472(73)80012-0
- Johnston RE (1979) Olfactory preferences, scent marking, and “proceptivity” in female hamsters. Horm Behav 13 (1):21-39. doi:10.1016/0018-506x(79)90032-1

- Johnston RE (2003) Chemical communication in rodents: From pheromones to individual recognition. *J Mammal* 84 (4):1141-1162
- Johnston RE, Chiang G, Tung C (1994) The information in scent over-marks of golden-hamsters. *Anim Behav* 48 (2):323-330
- Johnston RE, Derzie A, Chiang G, Jernigan P, Lee HC (1993) Individual scent signatures in golden-hamsters - evidence for specialization of function. *Anim Behav* 45 (6):1061-1070
- Johnston RE, Lee NA (1976) Persistence of the odor deposited by two functionally distinct scent marking behaviors of golden hamsters. *Behav Biol* 16 (2):199-210. doi:10.1016/s0091-6773(76)91310-9
- Johnston RE, Schmidt T (1979) Responses of hamsters to scent marks of different ages. *Behav Neural Biol* 26 (1):64-75. doi:10.1016/s0163-1047(79)92881-4
- Jones RB, Nowell NW (1977) Aversive potency of male mouse urine: A temporal study. *Behav Biol* 19 (4):523-526. doi:10.1016/s0091-6773(77)92008-9
- Jones RB, Nowell NW (1989) Aversive potency of urine from dominant and subordinate male laboratory mice (*Mus musculus*): Resolution of a conflict. *Aggressive Behav* 15 (4):291-296. doi:10.1002/ab.2480150404
- Kavaliers M, Colwell DD (1995a) Discrimination by Female Mice between the Odours of Parasitized and Non-Parasitized Males. *P Roy Soc Lond B Bio* 261 (1360):31-35. doi:10.1098/rspb.1995.0113
- Kavaliers M, Colwell DD (1995b) Odours of parasitized males induce aversive responses in female mice. *Anim Behav* 50 (5):1161-1169. doi:10.1016/0003-3472(95)80032-8
- Keverne EB (1999) The vomeronasal organ. *Science* 286 (5440):716-720

- Kikusui T, Takigami S, Takeuchi Y, Mori Y (2001) Alarm pheromone enhances stress-induced hyperthermia in rats. *Physiol Behav* 72 (1-2):45-50
- Kiyokawa Y, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2004) Modulatory role of testosterone in alarm pheromone release by male rats. *Horm Behav* 45 (2):122-127
- Kiyokawa Y, Shimozuru M, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2006) Alarm pheromone increases defensive and risk assessment behaviors in male rats. *Physiol Behav* 87 (2):383-387
- Klein SL, Gamble HR, Nelson RJ (1999) *Trichinella spiralis* infection in voles alters female odor preference but not partner preference. *Behav Ecol Sociobiol* 45 (5):323-329. doi:10.1007/s002650050567
- Koivula M, Korpimäki E (2001) Do scent marks increase predation risk of microtine rodents? *Oikos* 95 (2):275-281
- Koivula M, Viitala J (1999) Rough-legged Buzzards use vole scent marks to assess hunting areas. *J Avian Biol* 30 (3):329-332
- Lai WS, Johnston RE (2002) Individual recognition after fighting by golden hamsters: a new method. *Physiol Behav* 76 (2):225-239
- Landete-Castillejos T (1997) Chemical communication in wild norway rats. University of Nottingham, Nottingham
- Landete-Castillejos T, Andres-Abellan M, Argandoña JJ, Garde J (2000) Distribution of the cabrer vole (*Microtus cabreræ*) in its first reported areas reassessed by live trapping. *Biol Conserv* 94 (1):127-130
- Lavenex P, Schenk F (1998) Olfactory traces and spatial learning in rats. *Anim Behav* 56 (5):1129-1136. doi:10.1006/anbe.1998.0873

- Lawrence B, Smith R (1989) Behavioral response of solitary fathead minnows, *Pimephales promelas*, to alarm substance. J Chem Ecol 15 (1):209-219. doi:10.1007/bf02027783
- Le Roux A, Cherry MI, Manser MB (2008) The effects of population density and sociality on scent marking in the yellow mongoose. J Zool 275 (1):33-40. doi:10.1111/j.1469-7998.2007.00404.x
- Liman ER (1996) Pheromone transduction in the vomeronasal organ. Curr Opin Neurobiol 6 (4):487-493. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388(96)80054-7
- Mackay-Sim A, Laing DG (1980) Discrimination of odors from stressed rats by non-stressed rats. Physiol Behav 24 (4):699-704. doi:10.1016/0031-9384(80)90400-x
- Mackaysim A, Laing DG (1981) The sources of odors from stressed rats. Physiol Behav 27 (3):511-513
- Madison DM, Mcshea WJ (1987) Seasonal changes in reproductive tolerance, spacing, and social organization in meadow voles: a microtine model. Am Zool 27 (3):899-908. doi:10.1093/icb/27.3.899
- Malan, Crowe TM (1997) Perch availability and ground cover: Factors that may constitute suitable hunting conditions for pale chanting goshawk families. S AFR J ZOOL 32 (1):14-20
- Mason RT, LeMaster MP, Müller-Schwarze D (2005) Chemical signals in vertebrates 10. Springer,
- Mathis A, Chivers DP, Smith R (1995) Chemical alarm signals: predator deterrents or predator attractants? Am Nat 145 (6):994-1005
- Mathis A, Smith RJ (1993) Chemical alarm signals increase the survival time of fathead minnows (*Pimephales promelas*) during encounters with northern pike (*Esox Lucius*). Behav Ecol 4 (3):260-265. doi:10.1093/beheco/4.3.260

- Meredith M (1998) Vomeronasal Function. *Chem Senses* 23 (4):463-466.
doi:10.1093/chemse/23.4.463
- Mira A, Marques CC, Santos SM, Rosario IT, Mathias ML (2008) Environmental determinants of the distribution of the cabrera vole (*Microtus cabrerae*) in Portugal: Implications for conservation. *Mamm Biol* 73 (2):102-110.
doi:10.1016/j.mambio.2006.11.003
- Moran NA (1992) The evolutionary maintenance of alternative phenotypes. *American Naturalist* 139:971-989
- Moser JC, Brownlee RC, Silverstein R (1968) Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. *J Insect Physiol* 14 (4):529-535. doi:10.1016/0022-1910(68)90068-1
- Nevison CM, Armstrong S, Beynon RJ, Humphries RE, Hurst JL (2003) The ownership signature in mouse scent marks is involatile. *P Roy Soc Lond B Bio* 270 (1527):1957-1963
- Ostfeld RS (1985) Limiting resources and territoriality in Microtine rodents. *Am Nat* 126 (1):1-15. doi:citeulike-article-id:395256
- Ostfeld RS (1990) The ecology of territoriality in small mammals. *Trends Ecol Evol* 5 (12):411-415. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347(90)90026-A
- Padilla D, Adolph S (1996) Plastic inducible morphologies are not always adaptive: The importance of time delays in a stochastic environment. *Evol Ecol* 10 (1):105-117. doi:10.1007/bf01239351
- Palomo LJ, Gisbert J (2002) Atlas de los mamíferos terrestres de españã. . Dirección general de conservación de la naturaleza - SECEM - SECEMU, Madrid
- Penn D, Potts WK (1998) Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends Ecol Evol* 13 (10):391-396. doi:10.1016/s0169-5347(98)01473-6

- Penn D, Schneider G, White K, Slev P, Potts W (1998) Influenza Infection Neutralizes the Attractiveness of Male Odour to Female Mice (*Mus musculus*). *Ethology* 104 (8):685-694. doi:10.1111/j.1439-0310.1998.tb00102.x
- Pita R, Beja P, Mira A (2007) Spatial population structure of the cabrera vole in Mediterranean farmland: The relative role of patch and matrix effects. *Biol Conserv* 134 (3):383-392
- Pita R, Mira A, Beja P (2006) Conserving the cabrera vole, *Microtus cabrae*, in intensively used mediterranean landscapes. *Agr Ecosyst Environ* 115 (1-4):1-5
- Pita R, Mira A, Beja P (2010) Spatial segregation of two vole species (*Arvicola sapidus* and *Microtus cabrae*) within habitat patches in a highly fragmented farmland landscape. *Eur J Wildlife Res* 56 (4):651-662. doi:10.1007/s10344-009-0360-6
- Pita R, Mira A, Beja P (2011) Assessing habitat differentiation between coexisting species: The role of spatial scale. *Acta Oecol* 37 (2):124-132. doi:10.1016/j.actao.2011.01.006
- Price EO (1999) Behavioral development in animals undergoing domestication. *App Anim Behav Sci* 65 (3):245-271
- Probst R, Pavlicev M, Viitala J (2002) UV reflecting vole scent marks attract a passerine, the great grey shrike *Lanius excubitor*. *J Avian Biol* 33 (4):437-440. doi:10.1034/j.1600-048X.2002.02760.x
- Rasa OAE (1973) Marking Behaviour and its Social Significance in the African Dwarf Mongoose, *Helogale undulata rufula*. *Z Tierpsychol* 32 (3):293-318. doi:10.1111/j.1439-0310.1973.tb01107.x
- Reichard UH, Boesch C (2003) Monogamy: Mating Strategies and Partnerships in Birds, Humans and Other Mammals. Cambridge University Press,

- Rich TJ, Hurst JL (1999) The competing countermarks hypothesis: reliable assessment of competitive ability by potential mates. *Anim Behav* 58:1027-1037
- Roberts C (2007) Scent marking. In: Wolff JO, Sherman PW (eds) *Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective*. University of Chicago Press, Chicago, p 627
- Roberts SC (1998) Behavioural Responses to Scent Marks of Increasing Age in Klipspringer *Oreotragus oreotragus*. *Ethology* 104 (7):585-592. doi:10.1111/j.1439-0310.1998.tb00093.x
- Roberts SC (2012) On the Relationship between Scent-Marking and Territoriality in Callitrichid Primates. *Int J Primatol* 33 (4):749-761. doi:10.1007/s10764-012-9604-5
- Roberts SC, Gosling LM (2001) The Economic Consequences of Advertising Scent Mark Location on Territories. In: Marchlewska-Koj A, Lepri J, Müller-Schwarze D (eds) *Chemical Signals in Vertebrates 9*. Springer US, pp 11-17. doi:10.1007/978-1-4615-0671-3_2
- Roberts SC, Gosling LM, Thornton EA, McClung J (2001) Scent-marking by male mice under the risk of predation. *Behav Ecol* 12 (6):698-705. doi:10.1093/beheco/12.6.698
- Rodriguez I, Boehm U (2009) Pheromone sensing in mice. *Results Probl Cell Differ* 47:77-96. doi:10.1007/400_2008_8
- Rottman SJ, Snowdon CT (1972) Demonstration and analysis of an alarm pheromone in mice. *J Comp Physiol Psych* 81 (3):483-490
- Rozenfeld FM, Rasmont R, Haim A (1994) Home site scent marking with urine and an oral secretion in the Golden Spiny Mouse (*Acomys russatus*). *Israel J Zool* 40:161-172

- Sam M, Vora S, Malnic B, Ma W, Novotny MV, Buck LB (2001) Neuropharmacology: Odorants may arouse instinctive behaviours. *Nature* 412 (6843):142-142
- Santos SM, Do Rosario IT, Mathias ML (2005) Microhabitat preference of the cabrera vole in a mediterranean cork oak woodland of southern Portugal. *Vie Milieu* 55 (1):53-59
- Santos SM, Simoes MP, Mathias MD, Mira A (2006) Vegetation analysis in colonies of an endangered rodent, the cabrera vole (*Microtus cabrerae*), in southern Portugal. *Ecol Res* 21 (2):197-207
- Sbarbati A, Osculati F (2006) Allelochemical communication in vertebrates: kairomones, allomones and synomones. *Cells Tissues Organs* 183 (4):206-219. doi:10.1159/000096511
- Sherman PW (1977) Nepotism and the evolution of alarm calls. *Science* 197 (4310):1246-1253. doi:10.1126/science.197.4310.1246
- Sherman PW (1985) Alarm calls of belding's ground squirrels to aerial predators: nepotism or self-preservation? *Behav Ecol Sociobiol* 17 (4):313-323. doi:10.1007/bf00293209
- Singer AG, Macrides F (1990) Aphrodisin: pheromone or transducer? *Chem Senses* 15 (2):199-203. doi:10.1093/chemse/15.2.199
- Sipos ML, Alterman LON, Perry B, Nyby JG, Vandenberg JG (1995) An ephemeral pheromone of female house mice: degradation by oxidation. *Anim Behav* 50 (1):113-120. doi:10.1006/anbe.1995.0225
- Sipos ML, Nyby JG, Serran MF (1993) An ephemeral sex pheromone of female house mice (*Mus domesticus*): Pheromone fade-out time. *Physiol Behav* 54 (1):171-174. doi:10.1016/0031-9384(93)90061-j

- Smith J, Hurst JL, Barnard CJ (1994) Comparing behaviour in wild and laboratory strains of the house mouse: Levels of comparison and functional inference. Behav Process 32 (1):79-86. doi:10.1016/0376-6357(94)90029-9
- Smith JM, Parker GA (1976) The logic of asymmetric contests. Anim Behav 24 (1):159-175. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0003-3472(76)80110-8
- Smith RJ (1992) Alarm signals in fishes. Rev Fish Biol Fisher 2 (1):33-63. doi:10.1007/bf00042916
- Smith RJF (1986) Evolution of alarm signals: role of benefits of retaining group members or territorial neighbors. Am Nat 128:604-610
- Stephens PA, Sutherland WJ (1999) Consequences of the Allee effect for behaviour, ecology and conservation. Trends Ecol Evol 14 (10):401-405
- Stopková R, Hladovcová D, Kokavec J, Vyoral D, Stopka P (2009) Multiple roles of secretory lipocalins (Mup, Obp) in mice. Folia Zool (58):29-40
- Thiessen D, Rice M (1976) Mammalian scent gland marking and social behavior. Psychol Bull 83 (4):505-539
- Thomas SA, Kaczmarek BK (2002) Scent-marking behaviour by male prairie voles, *Microtus ochrogaster*, in response to the scent of opposite- and same-sex conspecifics. Behav Process 60 (1):27-33
- Thomas SA, Wolff JO (2002) Scent marking in voles: a reassessment of over marking, counter marking, and self-advertisement. Ethology 108 (1):51-62
- Tienderen PHV (1997) Generalists, Specialists, and the Evolution of Phenotypic Plasticity in Sympatric Populations of Distinct Species. Evolution 51 (5). doi:10.2307/2411189
- Tirindelli R, Dibattista M, Pifferi S, Menini A (2009) From Pheromones to Behavior. Physiol R 89 (3):921-956. doi:10.1152/physrev.00037.2008

- Trivers RL (1971) The evolution of reciprocal altruism. *Q Rev Biol* 46 (1):35-57
- Valenta JG, Rigby MK (1968) Discrimination of the odor of stressed rats. *Science* 161 (3841):599-601
- Van Buskirk J, Relyea RA (1998) Selection for phenotypic plasticity in *Rana sylvatica* tadpoles. *Biol J Linn Soc* 65 (3):301-328. doi:10.1111/j.1095-8312.1998.tb01144.x
- Ventura J, Lopez-Fuster MJ, Cabrera-Millet M (1998) The cabrera vole, *Microtus cabrerae*, in Spain: a biological and a morphometric approach. *Neth J Zool* 48 (1):83-100
- Verberne G (1976) Chemocommunication among domestic cats, mediated by the olfactory and vomeronasal senses. II. The relation between the function of Jacobson's organ (vomeronasal organ) and Flehmen behaviour). *Z Tierpsychol* 42 (2):113-128
- Vieuille-Thomas C, Signoret JP (1992) Pheromonal transmission of an aversive experience in domestic pig. *J Chem Ecol* 18 (9):1551-1557
- Viitala J, Korpimäki E, Palokangas P, Koivula M (1995) Attraction of kestrels to vole scent marks visible in ultraviolet-light. *Nature* 373 (6513):425-427
- Whitman DW, Ananthakrishnan TN (2009) Phenotypic plasticity of insects: mechanisms and consequences. Science Publishers,
- Widén P (1994) Habitat quality for raptors: a field experiment. *J Avian Biol* 25:219-223
- Wilcox RM, Johnston RE (1995) Scent counter-marks: specialized mechanisms of perception and response to individual odors in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Psychol* 109:349-356
- Williams JR, Catania KC, Carter CS (1992) Development of partner preferences in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*): the role of social and sexual

- experience. *Horm Behav* 26 (3):339-349. doi:10.1016/0018-506x(92)90004-f
- Wilson EO (1975) Enemy specification in the alarm-recruitment system of an ant. *Science* 190 (4216):798-800. doi:10.1126/science.1198097
- Witkin SR, Fitkin MS (1979) Chickadee alarm calls: does mate investment pay dividends? *Anim Behav* 27:1275-1276
- Wolff JO (1993) Why Are Female Small Mammals Territorial? *Oikos* 68 (2):364-370
- Wolff JO, Mech SG, Thomas SA (2002) Scent marking in female prairie voles: a test of alternative hypotheses. *Ethology* 108 (6):483-494
- Wolff JO, Peterson JA (1998) An offspring-defense hypothesis for territoriality in female mammals. *Ethol Ecol Evol* 10 (3):227-239. doi:10.1080/08927014.1998.9522854
- Woodward RL, Bartos K, Ferkin MH (2000) Meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) and prairie voles (*M. ochrogaster*) differ in their responses to over-marks from opposite- and same-sex conspecifics. *Ethology* 106 (11):979-992
- Wu G-M, Boivin G, Brodeur J, Giraldeau L-A, Outreman Y (2010) Altruistic defence behaviours in aphids. *Bmc Evol Biol* 10 (1):1-10. doi:10.1186/1471-2148-10-19
- Wyatt TD (2003) Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste. Cambridge University Press,
- Wysocki CJ, Lepri JJ (1991) Consequences of removing the vomeronasal organ. *J Steroid Biochem* 39 (4, Part 2):661-669. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0960-0760(91)90265-7
- Ylönen H, Sundell J, Tiilikainen R, Eccard JA, Horne T (2003) Weasels' (*Mustela nivalis nivalis*) preference for olfactory cues of the vole (*Clethrionomys*

glareolus). Ecology 84 (6):1447-1452. doi:10.1890/0012-9658(2003)084[1447:wmnnpf]2.0.co;2

Zala SM, Potts WK, Penn DJ (2004) Scent-marking displays provide honest signals of health and infection. Behav Ecol 15 (2):338-344

Zalaquett C, Thiessen D (1991) The effects of odors from stressed mice on conspecific behavior. Physiol Behav 50 (1):221-227

CAPÍTULO 2

O PAPEL DA MARCAÇÃO ODORÍFERA EM POPULAÇÕES EXTREMAMENTE FRAGMENTADAS DE RATO DE CABRERA

The role of scent-marking in patchy and highly-fragmented populations of the Cabrera vole (*Microtus cabreræ* Thomas, 1906)

Aceite para publicação na revista *Zoological Science*

CAPÍTULO 2. THE ROLE OF SCENT-MARKING IN PATCHY AND HIGHLY-FRAGMENTED POPULATIONS OF THE CABRERA VOLE (*MICROTUS CABRERAE* THOMAS, 1906)

Luis Alexandre Piteira Gomes^{1,2}, António Paulo Pereira Mira^{2,3}, Eduardo Nuno Barata⁴

¹ Grupo de Ecossistemas e Paisagens Mediterrânicas - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora - Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

² Unidade de Biologia da Conservação, Universidade de Évora - Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

³ CIBIO - Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos - Pólo de Évora, Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, 4485-66 Vairão, Portugal

⁴ Departamento de Biologia, Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

Abstract

Rodent scent-marking is often used for territorial defence and self-advertisement, and both functions often entail the continuous scent-marking of a large area with high costs. In species with highly-fragmented populations and low density where the likelihood of social encounters is low, the costs of continuous scent-marking might overcome the associated fitness benefits; therefore, less intensive scent-marking only to signal

presence to the opposite sex may be used. This hypothesis was tested in captivity with the Cabrera vole, a species with highly-fragmented and low density populations. Firstly, to assess the unknown scent-marking behaviour of the Cabrera voles, we conducted an assay wherein voles could scent-mark a clean substrate. Both sexes marked with urine and faeces, but never with anogenital secretions, and the amount of scent-marks was not different between sexes. In the subsequent assay, voles of each sex were given the choice of scent-mark on clean substrates or on substrates previously scent-marked by males or females. Both sexes marked with urine a larger area on substrates pre-marked by the opposite sex than on substrates pre-marked by the same-sex and clean substrates; however, no differences were found in the frequency of faecal boli deposited on the three types of substrate, and no anogenital secretions were found. The clear preference of receivers to scent-mark with urine the substrate pre-marked by the opposite sex strongly suggests that Cabrera voles use urine scent-marking for inter-sexual communication, probably to increase mate-finding likelihood rather than for territorial defence and/or self-advertisement.

Keywords: Fragmented populations; Mate-finding; *Microtus cabreræ*; Patchy distribution; Scent-marking; Voles.

Introduction

Scent-marking is used by a variety of animals to convey olfactory information to conspecifics even when the scent-donors are away. Such behaviour has been studied extensively in mammals, particularly rodents (e.g. (Johnston et al. 1993; Rich and Hurst

1999; Thomas and Wolff 2002; Wolff et al. 2002) that typically scent-mark by deposition of faeces, urine and/or dragging the anogenital region on the substrate (Ferkin 2001; Ferkin and Johnston 1995; Eisenberg and Kleiman 1972). Scent-marking behaviour seems to serve multiple and overlapping functions (Becker et al. 2012; Ferkin et al. 2004; Ferkin et al. 2001). For instance, both the prairie vole (*Microtus ochrogaster*) and meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*) use scent-marking for territorial defence and for mate-advertisement (Ferkin et al. 2001; Ferkin et al. 2004). Other findings have indicated that scent-marking behaviour in those same species is used also for advertise self-presence and, possibly, individual identity to conspecifics (self-advertisement) (Thomas and Kaczmarek 2002; Thomas and Wolff 2002; Wolff et al. 2002).

The use of scent-marking for self-advertisement and territorial defence implies that individuals spread continuously their marks across relative large areas (Brown and McDonald 1985; Hurst 1990; Humphries et al. 1999; Thomas and Wolff 2002; Johnston et al. 1994) with high energetic costs and predation risk (Gosling et al. 2000; Mason et al. 2005; Koivula and Korpimäki 2001). Both functions appear to be important in species that usually face relative high levels of intra-sexual competition due to individuals inhabiting contiguous or overlapping territories and/or having large home ranges, as often occurs in generalist and widespread rodents (Ferkin et al. 2004; Thomas and Wolff 2002; Wolff et al. 2002; Hurst and Beynon 2004; Getz et al. 2005; Madison and McShea 1987; Getz and Carter 1996). In such conditions the probability of physical encounters is relatively high and the scent-marks are the first stage of social mediation among conspecifics (Hurst and Beynon 2004) being important, for instance, in reducing agonistic encounters between intra-sexual competitors (Gosling 1982, 1990). However, in species with extremely-fragmented and low density populations where individuals

occupy isolated habitat patches the probability of finding conspecifics is extremely low being mate-location the major constraint to ensure the reproductive success (Courchamp et al. 2009; Courchamp et al. 1999; Stephens and Sutherland 1999). Also, in low density populations, intra-sexual competition is low and the costs associated with scent-marking behaviour for territorial defence and/or self-advertisement may overcome its benefits. Although communication through scent-marking diverge between rodent species depending on their mating system (Becker et al. 2012; Ferkin et al. 2004), to our knowledge, no studies have been conducted to investigate whether the functions of scent-marking are more restrict in rodent species that typically inhabit patchy and fragmented habitats at low population densities. Nevertheless, population density has been shown to affect scent-marking communication in yellow mongooses, *Cynictis penicillata* (Le Roux et al. 2008).

The current study investigated the scent-marking behaviour and function(s) in the Cabrera vole (*Microtus cabreræ* Thomas, 1906), a rare microtine species, endemic from the Iberian Peninsula and occurring as low-density and extremely-fragmented populations (Mira et al. 2008; Pita et al. 2007; Pita et al. 2006). It is considered a habitat specialist that lives in areas associated with humid, tall herb communities (Fernandez-Salvador 1998; Landete-Castillejos et al. 2000; Pita et al. 2007; Pita et al. 2006; Santos et al. 2005; Santos et al. 2006), which are relatively rare and marginal habitats that occur as isolated and extremely disperse patches (Pita et al. 2006). Cabrera voles seem to have a monogamous mating system and a K-type reproduction strategy (Fernandez-Salvador et al. 2001; Ventura et al. 1998; Fernandez-Salvador 1998) with breeding pairs for relatively long periods (over 10 months) during which males share the nest with females and pups, also providing parental care (Fernandez-Salvador et al. 2001; Fernandez-Salvador 1998; Fernandez-Salvador et al. 2005b). The monogamous mating

system of the Cabrera vole share many features with that described for the congener prairie vole (Getz and Carter 1996; Carter and Getz 1993). However, in contrast to the Cabrera voles, prairie voles typically live in non-fragmented habitats forming relatively large colonies or communal groups (Getz and Carter 1996) wherein frequent encounters between conspecifics occur (Getz and Carter 1996; McGuire et al. 1990). In these environmental conditions, the scent-marking communication in prairie voles seems to have multiple functions (mate-advertisement, territorial defence and self-advertisement) inferred from laboratory studies that have investigated the scent-marking behaviour of donors and receivers (Ferkin et al. 2004; Ferkin et al. 2001; Thomas and Wolff 2002; Wolff et al. 2002). For the Cabrera vole, the highly-fragmented and low density populations limit the encounters among conspecifics, and intra-sexual competition is likely low. Accordingly, we hypothesize that the main function of scent-marking communication in Cabrera voles is mate-advertisement to increase the likelihood of finding a partner rather than self-advertisement or territorial defence, both of which typically have higher energetic costs and predation risk without any apparent benefit in the reproduction of Cabrera voles.

Typically rodents respond to conspecific scent-marks by counter-marking or over-marking them (Thomas and Wolff 2002; Johnston et al. 1994; Johnston et al. 1995; Ferkin 1999; Johnston 2003), and the function(s) of scent-marking communication can be inferred from the way receivers of each sex respond to scent-marks from conspecific donors (e.g.(Johnston et al. 1993; Ferkin et al. 2001; Becker et al. 2012; Ferkin et al. 2004). The current study was carried out in captivity to describe the scent-marking behaviour of Cabrera voles of both sexes, and to infer its function(s) by assessing the scent-marking behaviour in response to scent-marks from donors of each sex.

Methods

Study animals

All voles used were wild-caught adults (body weight >28 g, (Fernandez-Salvador et al. 2005b; Fernandez-Salvador et al. 2005a) in southern Portugal. Voles were caught using Sherman live traps (7 × 23 × 9 cm) baited with apple and supplied with hay and hydrophobic cotton for bedding (Pita et al. 2010). Traps were placed at sites of likely capture, which were assessed by checking eaten apple trails left in the area over the previous 2–4 days. Once set, the traps were checked every 8h. Pregnant females were identified by abdominal palpation, and returned to their habitat. In captivity, the voles were housed individually in glass cages (70 × 40 × 40 cm) prepared with soil and vegetation to mimic their original habitat, and kept in a room at 18 - 21°C under a long photoperiod (14:10 h, L:D). Food (diverse grass species collected daily supplemented with apples) and water were provided *ad libitum* (Fernandez-Salvador et al. 2001). All the procedures were done with the permission of Portuguese governmental authorities (i.e. Institute for Nature and Biodiversity Conservation) and conformed to the guidelines approved by the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research (Gannon et al. 2007), and to the guidelines for the treatment of animals in behavioural research (ASAB 2006). Moreover, at the end of the experiments, all animals were released at the same location where they had been caught.

Experiment 1

The first experiment was carried out to describe the source and extension of possible scent-marks of each sex in response to a clean substrate. In each replicate one female or one male (hereafter called scent-donors) was placed in a small glass arena ($63 \times 29.7 \times 40$ cm) with the bottom covered with a clean paper sheet (substrate); scent-mark behaviour was allowed for 30 min. Then, the specimen was removed from the arena and returned to the respective home cage, and the substrate dried for 10 min. The dried substrate was then observed in a dark-room and scent-marks (i.e. urine, faeces and anogenital marks) were identified under UV-light (Desjardins et al. 1973). Each mark was traced lightly with a pencil and then photographed with a 5 Mpx Digital Camera for assessment of scent-marked areas using Quantum-GIS software (QGis 2011). According to studies in other vole species, different kinds of marking are distinguished by the different characteristics they show under UV-light: urine appears as bluish spots; faeces appears as darkish brown streaks or boli; and anogenital secretion marks typically appear as silver-white slivers between 0.5 and 3 cm long, and from 0.1 to 0.3 cm wide (Wolff et al. 2002). As scent-donors, 15 adult non-paired (i.e. 7 days without contact with conspecifics) males and 15 adult non-paired females were used. To prevent contamination with human scents disposable latex gloves were used to manipulate all substrates. Scent-marked substrates were stored for a maximum of two weeks in clean plastic pockets at -20°C until use in the second experiment.

Experiment 2

The second experiment was carried out to assess the function of scent-marking in Cabrera voles by investigating the scent-marking behaviour of each sex when exposed

simultaneously to clean substrates, substrates previously scent-marked by males and substrates previously scent-marked by females.

The pre-marked substrates from each sex obtained in experiment 1 (thawed for 30 min at room temperature) and an equal-size unmarked substrate (i.e. clean paper sheet) were placed side-by-side at the bottom of a glass arena ($89.1 \times 63 \times 40$ cm; Fig. 1). To control for possible side-choice bias in the arena, the side of the marked substrates from each sex donor was switched between replicates. In each replicate, one male or one female was placed in the centre of the arena inside a bottomless mesh cage for two minutes. Then, the cage was removed using a remote device to avoid visual contact with the observer allowing the specimen to scent-mark for 30 min. New marks in each test substrate (clean, female donor and male donor) were identified and analyzed following the procedure described above in experiment 1. Overlapping areas between initial and secondary marks were identified and measured (Wolff et al. 2002; Johnston 1999; Ferkin and Pierce 2007); initial and secondary marks were distinguishable by the colour difference under UV-light. The experiment was replicated with 15 non-paired adults of each sex.

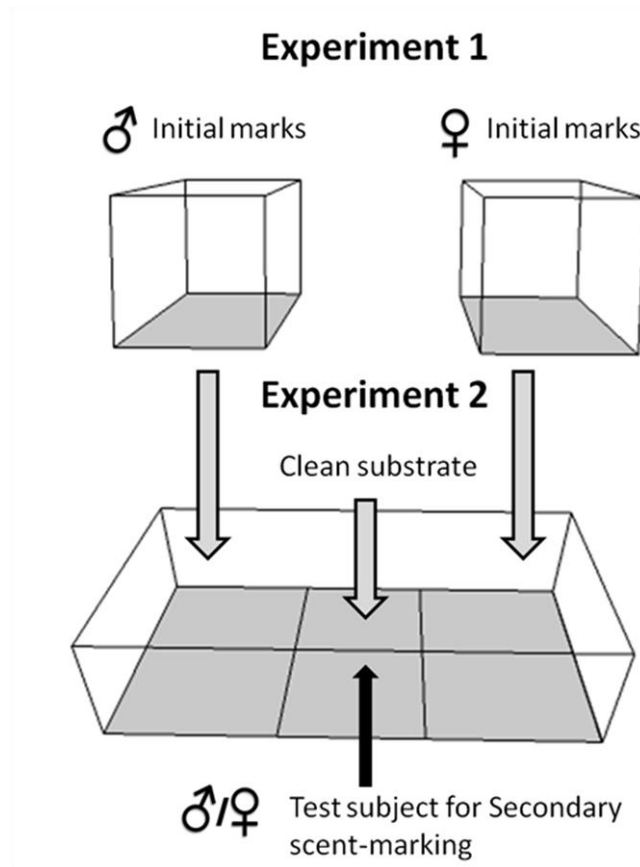


Fig. 1 Drawing illustrating the scent-marking arenas used in experiments 1 and 2. Scent-marked substrates from each sex (experiment 1) were placed side-by-side with an unmarked substrate of the same size in a larger arena where individual males or females were allowed to scent-mark for 30 min (experiment 2).

Data analysis

Scent-mark analysis was carried out with frequency data (Wolff et al. 2002; Thomas and Wolff 2002; Thomas and Kaczmarek 2002) except for urine marks for which the area was used instead, since the shape and size of urine marks were highly variable. Non-parametric statistics was used in all analyses. Mann-Whitney U tests were used to compare scent-marking frequency (faecal boli) and area (total area marked with urine)

between sexes in clean substrate (experiment 1). Secondary scent-marking data from each sex in experiment 2, i.e. faecal boli frequency and total urine area, were compared among the three types of substrate (i.e., male pre-marked; female pre-marked; non pre-marked) using the Friedman's rank test and Dunn-Bonferroni tests for *post hoc* comparisons (Dunn 1964). In all multiple comparisons tests, the *p* values were adjusted with Bonferroni correction. Additionally, we tested for association between initial scent-marks and secondary scent-marks using Spearman's rank correlations.

To determine occurrence of over-marking, i.e. whether secondary scent-marks overlap the initial scent-mark area more than expected for a random distribution of secondary scent-marks, the observed overlapping areas were compared with those expected randomly, for each combination (animal test sex: sex of initial marks donor) using Wilcoxon signed-rank tests. Expected overlapping areas were accounted by multiplying the proportion of substrate area occupied by the initial marks with the area of all the secondary marks placed over the same substrate (adapted from (Thomas and Wolff 2002; Humphries et al. 1999).

All statistical procedures were performed using the statistical package PASW version 18 (SPSS for Windows 2009).

Results

Experiment 1

When exposed to the clean substrate, Cabrera voles only used urine and faeces marks. No anogenital marks were detected. Males marked an area of $53.41 \pm 8.09 \text{ cm}^2$ (mean \pm SE) with urine and placed 4.67 ± 2.56 faecal boli, while the area marked by females was

$46.71 \pm 7.90 \text{ cm}^2$ and the number of faecal boli was 2.68 ± 1.21 (Fig. 2). Sexes did not differ in the area covered by urine (Mann-Whitney $U = 128.00$, $n = 30$, $P = 0.539$) nor in the number of faecal boli (Mann-Whitney $U = 120.50$, $n = 30$, $P = 0.744$).

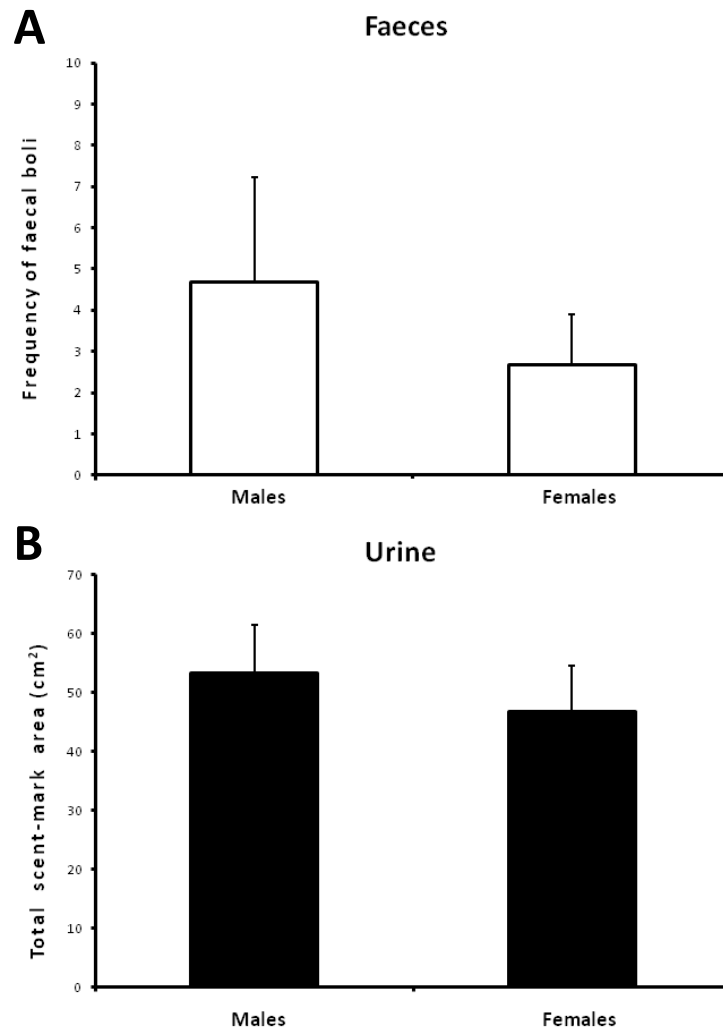


Fig 2 Mean (\pm SE) number of faecal boli (A; white bars) and total urine marked area (B; black bars) produced over 30-minute trials by 15 females versus 15 males over clean substrate.

Experiment 2

Males had a significant preference to scent-mark with urine on the substrate pre-marked by females than on the male pre-marked substrates and non pre-marked substrate (Friedman test: $\chi^2 = 18.42$, d.f. = 2, $n = 15$, $P < 0.01$; Fig. 3 A). No significant differences were observed in the number of faecal boli located across the three substrates conditions (Friedman test: $\chi^2 = 3.57$, d.f. = 2, $n = 15$, $P = 0.168$): 4.13 ± 1.21 (mean \pm SE) faecal boli on the substrate pre-marked by females; 3.27 ± 0.97 faecal boli on the substrate pre-marked by males; and 2.13 ± 0.72 faecal boli on the non-pre-marked substrate. Similarly to the male trials, females had a significant preference to scent-mark with urine on the substrate pre-marked by the opposite-sex (Friedman test: $\chi^2 = 18.35$, d.f. = 2, $n = 15$, $P < 0.01$; Fig. 3 B). Also, no differences were detected in the number of faecal boli placed by females as secondary marks on each of the three types of substrate (Friedman test: $\chi^2 = 0.45$, d.f. = 2, $n = 15$, $P = 0.798$): 1.93 ± 0.75 faecal boli on the substrate pre-marked by males; 1.40 ± 0.67 faecal boli on the substrate pre-marked by females; and 0.87 ± 0.45 faecal boli on the non pre-marked substrate.

For both sexes, no significant association was found between initial scent-mark area and secondary scent-mark area (males: Spearman's $\rho = 0.17$, $n = 30$, $P = 0.373$; females: $\rho = 0.21$, $n = 30$, $P = 0.253$).

Secondary scent-marks overlapped initial marks randomly on the pre-marked substrates (scent donor vs. test subject: males vs. males, Wilcoxon signed-rank test: $z = -0.87$, $n = 15$, $P = 0.386$; males vs. females, $z = 1.17$, $n = 15$, $P = 0.241$; females vs. males, $z = 1.38$, $n = 15$, $P = 0.169$; females vs. females, $z = -1.54$, $n = 15$, $P = 0.123$).

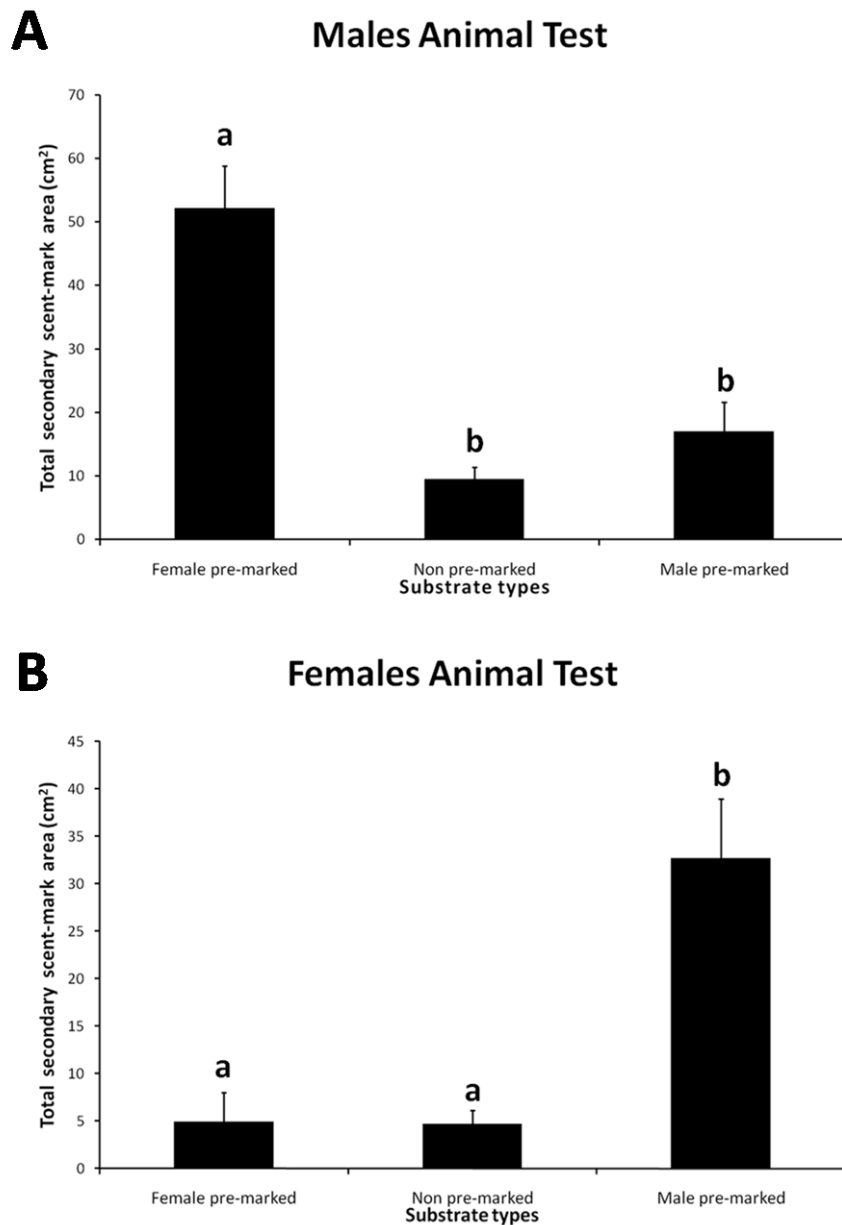


Fig. 3 Total area (mean \pm SE) of urine secondary scent-marks located over female pre-marked substrate (female pms), non-pre-marked substrate (non pms) and male pre-marked substrate (male pms), for males (A; $n = 15$) and females (B; $n = 15$) in experiment 2. Different letters indicate significant differences between substrate pairs using Dunn-Bonferroni pairwise post hoc test: (A) female pms vs. male pms, $Z = -3.05$, $P < 0.01$; female pms vs. non pms, $Z = -3.30$, $P < 0.01$; male pms vs. non pms, $Z = -1.16$, $P = 1.00$; (B) female pms vs. male pms, $Z = -2.84$, $P < 0.01$; male pms vs. non pms, $Z = -3.12$, $P < 0.01$; female pms vs. non pms, $Z = -0.80$, $P = 1.00$.

Discussion

The results showed that Cabrera voles of both sexes use only urine to counter-mark preferentially on substrates previously marked with urine by donors of the opposite-sex. The preferential placement of urine scent-marks over and/or in the proximity to opposite-sex marks suggests that urine scent-marks advertise the proximity of a potential mate thereby increasing the likelihood of a sexual encounter and subsequent copula consummation. Similar to what has been suggested for two congener voles (Ferkin et al. 2001), counter-marking the scent-marks of opposite-sex conspecifics may advertise the availability of a potential mate to the previous scent donors and likely inform about receptivity for mating in Cabrera voles. Furthermore, no differences were observed between urine-marked area on the same-sex pre-marked substrates and the non pre-marked substrates, and the areas of urine counter-marks in these two types of substrates were relatively low and clearly smaller than those found on the opposite-sex pre-marked substrates; also no over-marking was observed on the same-sex pre-marked substrates. These observations do not support that Cabrera voles use urine scent-marking communication for territorial defence since the prediction for such function would be that either males or females would mark more often on same-sex pre-marked substrates than on clean substrates (Humphries et al. 1999; Hurst 1990) and/or would over-mark the same-sex initial scent-marks (Ferkin et al. 2004). In addition, both sexes did not avoid overlapping urine marks with the initial marks of other individuals, suggesting that there is no scent-blending avoidance strategy in Cabrera voles to maximize information about the identity of the scent donors (self-advertisement) (Thomas and Kaczmarek 2002; Thomas and Wolff 2002). Therefore, the results of the current study suggest that urine scent-marking communication in Cabrera voles is

directed towards the opposite-sex to increase the likelihood of finding a mate, rather than for territorial defence or self-advertisement.

In the congener monogamous prairie vole scent-marking communication seems to have three functions: mating-advertisement, self-advertisement and territorial defence (Ferkin et al. 2004; Ferkin et al. 2001; Thomas and Kaczmarek 2002; Thomas and Wolff 2002; Wolff et al. 2002). Also, the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*) use scent-marking for both mate-advertisement and territorial defence (Becker et al. 2012). The differences in scent-marking communication between Cabrera voles and prairie voles or California mice, all with similar mating system, may relate with differences in their spatial population structure. In contrast to the both aforementioned rodents, Cabrera voles live as spatially structured populations of low density in patchy and extremely-fragmented environments (Mira et al. 2008; Palomo and Gisbert 2002; Pita et al. 2007; Pita et al. 2006) where the frequency of conspecific encounters and inherent intensity of intra-sexual competition are relatively low. The highest densities that have been reported for Cabrera vole populations range between 115 ind/ha (Fernandez-Salvador et al. 2005b) and 250 ind/ha (Landete-Castillejos et al. 2000), however, these density estimations are likely overestimated since the methodology employed did not take into account the patchy distribution of Cabrera voles. Using a spatially explicit capture-recapture method adequate for population density estimation in the patchy fragmented populations of Cabrera voles, it was estimated a density of 8 ind/ha in Southern Portugal (Mira et al., unpublished). In such environment and social conditions scent-marking communication for territorial defence and/or self-advertisement seems not to be of significant adaptive value due to the high inherent costs of such intensive and extensive scent-marking which is physiologically demanding (Gosling et al. 2000) and may attract predators (Viitala et al. 1995; Koivula

and Korpimäki 2001; Probst et al. 2002). Thus, the main function of urine scent-marking communication in the Cabrera vole seems to be mate-advertisement, and the apparent absence of territorial defence and self-advertisement roles may be explained by lack of adaptive value of those two functions in the highly-fragmented and low density populations of the Cabrera vole.

We hypothesize that both the low density and high fragmentation of Cabrera voles' populations with inherent low frequency of encounters among conspecifics and low intra-sexual competition do not confer a significant adaptive value to the costly scent-marking required for territorial defence and/or self-advertisement functions. The reasoning implies that the evolution of scent-marking communication functions might be shaped by patchy and fragmented populations of low density; however, further comparative studies are needed to support or discard this hypothesis. Also, it should not be discarded a possible phenotypic plasticity that adjusts scent-marking behaviour to the population density and intensity of social encounters. A recent study with yellow mongooses (Le Roux et al. 2008) showed that population density affects the intensity of territorial scent-marking behaviour, being intensive in subordinate group members of a high-density population and almost absent in subordinates of a low density population. In voles and rodents in general, is not known whether scent-marking behaviour can be adjusted by the population density through phenotypic plasticity, but such hypothesis deserves further investigation.

The absence of scent-marks from anogenital area in the current study contrasts with findings in the congener meadow and prairie voles for which both urine and anogenital secretions are important in their scent-marking communication (Ferkin et al. 1994; Ferkin and Johnston 1995; Ferkin 2001). It is not yet clear why Cabrera voles did not

release anogenital secretions and only urine seems to have a role in inter-sexual scent-marking communication. In terrestrial voles the urine, faeces, anogenital secretions and scents from different integument areas seem to have different roles in chemical communication, and it has been suggested that the number of scent sources for signalling opposite-sex increase with the number of encounters among individuals of both sexes (Ferkin 2001). Possibly, the absence of anogenital secretions in Cabrera voles may relate with the low frequency of encounters among conspecifics and urine only might be enough to convey the information about sex and readiness to mate since it contains reliable chemical information (e.g. gonadal hormones and its metabolites) that reflects the sex and physiological condition of the releaser.

In conclusion, the results of the current study showed that urine is the single source of scent used in scent-marking communication in Cabrera voles, and suggest that urine scent-marking is used only for mate-advertisement without any apparent role in territorial defence and/or self-advertisement. The hypothesis that urine scent-marking communication in Cabrera voles is restricted to mate-advertisement due to its fragmented populations of low density is not discarded but further studies are needed for a stronger support. More comparative studies are necessary to determine whether population density is an important pressure shaping the evolution of scent-marking communication in voles and, more generally, in rodents. Furthermore, the hypothesis that phenotypic plasticity allows adjusting the scent-marking behaviour to population density deserves further attention in rodents.

Acknowledgments

This study was funded by the Portuguese Foundation for Science and Technology through a PhD grant awarded to LG (SFRH / BD / 23699 / 2005). Further support was provided by a grant awarded to LG by the University of Évora – Programa Bento de Jesus Caraça. Capture and handling of voles were conducted with the permission of the Portuguese nature conservation authority (ICNB). We are grateful to Pedro Salgado for his assistance in field data collection. We are also grateful to Professor Alfredo Pereira for providing the laboratory space where the work was carried out.

Bibliography

- ASAB (2006) Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. *Anim Behav* 71:245-253
- Becker EA, Petrino S, Marler CA (2012) A comparison of scent marking between a monogamous and promiscuous Species of *Peromyscus*: pair bonded males do not advertise to novel females. *Plos One* 7 (2):e32002.
doi:10.1371/journal.pone.0032002
- Brown RE, McDonald DW (1985) Social odours in mammals, vol 1 & 2. Brown, R. E. McDonald, D. W. edn. Clarendon Press, Oxford
- Carter CS, Getz LL (1993) Monogamy and the prairie vole. *Sci Am* 268 (6):100-106
- Courchamp F, Berec L, Gascoigne J (2009) Allee effects in ecology and conservation. Oxford University Press,
- Courchamp F, Clutton-Brock T, Grenfell B (1999) Inverse density dependence and the Allee effect. *Trends Ecol Evol* 14 (10):405-410

- Desjardins C, Maruniak JA, Bronson FH (1973) Social rank in house mice: differentiation revealed by ultraviolet visualization of urinary marking patterns. Science 182 (4115):939-941
- Dunn OJ (1964) Multiple comparisons using rank sums. Technometrics 6:241-252
- Eisenberg JF, Kleiman DG (1972) Olfactory communication in mammals. Annu Rev Ecol Syst 3:1-32
- Ferkin MH (1999) Meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*, Arvicolidae) over-mark and adjacent-mark the scent marks of same-sex conspecifics. Ethology 105 (10):825-837
- Ferkin MH (2001) Patterns of sexually distinct scents in *Microtus spp.* Can J Zool 79 (9):1621-1625
- Ferkin MH, Ferkin FH, Richmond M (1994) Sources of scent used by prairie voles, *Microtus ochogaster*, to convey sexual identity to conspecifics. Can J Zool 72 (12):2205-2209
- Ferkin MH, Johnston RE (1995) Meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, use multiple sources of scent for sex recognition. Anim Behav 49 (1):37-44
- Ferkin MH, Li HZ, Leonard ST (2004) Meadow voles and prairie voles differ in the percentage of conspecific marks they over-mark. Acta Ethol 7 (1):1-7
- Ferkin MH, Mech SG, Paz-Y-Mino G (2001) Scent marking in meadow voles and prairie voles: a test of three hypotheses. Behaviour 138:1319-1336
- Ferkin MH, Pierce AA (2007) Perspectives on over-marking: is it good to be on top? J Ethol 25 (2):107-116
- Fernandez-Salvador R (1998) Topillo de cabrera, *Microtus cabrerae* Thomas, 1906. Galemys 10 (2):5-18

- Fernandez-Salvador R, Garcia-Perea R, Ventura J (2001) Reproduction and postnatal growth of the cabrera vole, *Microtus cabrerae*, in captivity. *Can J Zool* 79 (11):2080-2085
- Fernandez-Salvador R, Garcia-Perea R, Ventura J (2005a) Effect of climatic fluctuations on body mass of a mediterranean vole, *Microtus cabrerae*. *Mamm Biol* 70 (2):73-83
- Fernandez-Salvador R, Ventura J, Garcia-Perea R (2005b) Breeding patterns and demography of a population of the cabrera vole, *Microtus cabrerae*. *Anim Biol* 55 (2):147-161
- Gannon WL, Sikes RS, Mammalogists ACaUCotASo (2007) Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal* 88:809-823
- Getz LL, Carter CS (1996) Prairie vole partnerships. *Am Sci* 84 (56-62)
- Getz LL, McGuire B, Carter CS (2005) Social organization and mating system of free-living prairie voles *Microtus ochrogaster*: a review. *Acta Zool Sinica* 51 (2):178-186
- Gosling LM (1982) A reassessment of the function of scent marking in territories. *Z Tierpsychol* 60 (2):89-118
- Gosling LM (1990) Scent-marking by resource holders: alternative mechanisms for advertising the costs of competition. In: MacDonald DW, Müller-Schwarze D, Natynczuk SE (eds) *Chemical Signals in Vertebrates*, vol 5. Oxford Univ. Press, Oxford, p 315—328
- Gosling LM, Roberts SC, Thornton EA, Andrew MJ (2000) Life history costs of olfactory status signalling in mice. *Behav Ecol Sociobiol* 48 (4):328-332

- Humphries RE, Robertson DHL, Beynon RJ, Hurst JL (1999) Unravelling the chemical basis of competitive scent marking in house mice. *Anim Behav* 58:1177-1190
- Hurst JL (1990) Urine marking in populations of wild house mice *Mus-Domesticus* Ratty .1. communication between males. *Anim Behav* 40:209-222
- Hurst JL, Beynon RJ (2004) Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *Bioessays* 26 (12):1288-1298
- Johnston RE (1999) Scent over-marking: how do hamsters know whose scent is on top and why should it matter. In: Johnston RE, Muller-Schwarze D, Sorenson PW (eds) *Advances in chemical signals in vertebrates*. Plenum Press, New York, pp 227-238
- Johnston RE (2003) Chemical communication in rodents: From pheromones to individual recognition. *J Mammal* 84 (4):1141-1162
- Johnston RE, Chiang G, Tung C (1994) The information in scent over-marks of golden-hamsters. *Anim Behav* 48 (2):323-330
- Johnston RE, Derzie A, Chiang G, Jernigan P, Lee HC (1993) Individual scent signatures in golden-hamsters - evidence for specialization of function. *Anim Behav* 45 (6):1061-1070
- Johnston RE, Munver R, Tung C (1995) Scent counter marks: selective memory for the top scent by golden hamsters. *Anim Behav* 49 (6):1435-1442. doi:Doi: 10.1016/0003-3472(95)90064-0
- Koivula M, Korpimaki E (2001) Do scent marks increase predation risk of microtine rodents? *Oikos* 95 (2):275-281
- Landete-Castillejos T, Andres-Abellan M, Argandona JJ, Garde J (2000) Distribution of the cabrera vole (*Microtus cabreræ*) in its first reported areas reassessed by live trapping. *Biol Conserv* 94 (1):127-130

- Le Roux A, Cherry MI, Manser MB (2008) The effects of population density and sociality on scent marking in the yellow mongoose. *J Zool* 275 (1):33-40. doi:10.1111/j.1469-7998.2007.00404.x
- Madison DM, Mcshea WJ (1987) Seasonal changes in reproductive tolerance, spacing, and social organization in meadow voles: a microtine model. *Am Zool* 27 (3):899-908. doi:10.1093/icb/27.3.899
- Mason RT, LeMaster MP, Müller-Schwarze D (2005) Chemical signals in vertebrates 10. Springer,
- McGuire B, Pizzuto T, Getz LL (1990) Potential for social interaction in a natural population of prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Can J Zoolog* 68 (2):391-398. doi:10.1139/z90-056
- Mira A, Marques CC, Santos SM, Rosario IT, Mathias ML (2008) Environmental determinants of the distribution of the cabrera vole (*Microtus cabrerae*) in Portugal: Implications for conservation. *Mamm Biol* 73 (2):102-110. doi:10.1016/j.mambio.2006.11.003
- Palomo LJ, Gisbert J (2002) Atlas de los mamíferos terrestres de españã. . Dirección general de conservación de la naturaleza - SECEM - SECEMU, Madrid
- Pita R, Beja P, Mira A (2007) Spatial population structure of the cabrera vole in Mediterranean farmland: The relative role of patch and matrix effects. *Biol Conserv* 134 (3):383-392
- Pita R, Mira A, Beja P (2006) Conserving the cabrera vole, *Microtus cabrerae*, in intensively used mediterranean landscapes. *Agr Ecosyst Environ* 115 (1-4):1-5
- Pita R, Mira A, Beja P (2010) Spatial segregation of two vole species (*Arvicola sapidus* and *Microtus cabrerae*) within habitat patches in a highly fragmented farmland landscape. *Eur J Wildlife Res* 56 (4):651-662. doi:10.1007/s10344-009-0360-6

- Probst R, Pavlicev M, Viitala J (2002) UV reflecting vole scent marks attract a passerine, the great grey shrike *Lanius excubitor*. *J Avian Biol* 33 (4):437-440. doi:10.1034/j.1600-048X.2002.02760.x
- QGis DT (2011) Quantum gis geographic information system.
- Rich TJ, Hurst JL (1999) The competing countermarks hypothesis: reliable assessment of competitive ability by potential mates. *Anim Behav* 58:1027-1037
- Santos SM, Do Rosario IT, Mathias ML (2005) Microhabitat preference of the cabrera vole in a mediterranean cork oak woodland of southern Portugal. *Vie Milieu* 55 (1):53-59
- Santos SM, Simoes MP, Mathias MD, Mira A (2006) Vegetation analysis in colonies of an endangered rodent, the cabrera vole (*Microtus cabrerae*), in southern Portugal. *Ecol Res* 21 (2):197-207
- SPSS for Windows 18. 2009. Chicago, IL: SPSS, Inc.
- Stephens PA, Sutherland WJ (1999) Consequences of the Allee effect for behaviour, ecology and conservation. *Trends Ecol Evol* 14 (10):401-405
- Thomas SA, Kaczmarek BK (2002) Scent-marking behaviour by male prairie voles, *Microtus ochrogaster*, in response to the scent of opposite- and same-sex conspecifics. *Behav Process* 60 (1):27-33
- Thomas SA, Wolff JO (2002) Scent marking in voles: a reassessment of over marking, counter marking, and self-advertisement. *Ethology* 108 (1):51-62
- Ventura J, Lopez-Fuster MJ, Cabrera-Millet M (1998) The cabrera vole, *Microtus cabrerae*, in Spain: a biological and a morphometric approach. *Neth J Zool* 48 (1):83-100
- Viitala J, Korpimäki E, Palokangas P, Koivula M (1995) Attraction of kestrels to vole scent marks visible in ultraviolet-light. *Nature* 373 (6513):425-427

Wolff JO, Mech SG, Thomas SA (2002) Scent marking in female prairie voles: a test of alternative hypotheses. *Ethology* 108 (6):483-494

CAPÍTULO 3

O EFEITO DO VÍNCULO DE CASAL NA MARCAÇÃO ODORÍFERA DE RATO DE CABRERA

The effect of pair bonding in Cabrera vole's scent-marking

Submetido á revista *Acta ethologica*

CAPÍTULO 3. THE EFFECT OF PAIR BONDING IN CABRERA VOLE'S SCENT-MARKING

**Luis Alexandre Piteira Gomes^{1,2}, Pedro Miguel Pedreirinho Salgado², Eduardo
Nuno Picoto Lopes Barata³, António Paulo Pereira Mira^{2,4}**

¹ Grupo de Ecossistemas e Paisagens Mediterrânicas - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais
Mediterrânicas, Universidade de Évora - Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

² Unidade de Biologia da Conservação, Universidade de Évora - Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7002-
554 Évora, Portugal

³ Departamento de Biologia, Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

⁴ CIBIO - Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos - Pólo de Évora, Portugal

Abstract

The Cabrera vole (*Microtus cabreræ*) is a rare rodent living in patchy grassy areas of Iberian Peninsula where both sexes use scent-marking exclusively to increase their mate-finding likelihood. Apparently Cabrera voles establish pair bonds with opposite-sex conspecifics constituting a breeding pair, which is expected to reduce the efforts in searching for a new mate. In such circumstances, scent-marking as a strategy to increase mate-finding likelihood became useless. Accordingly, we hypothesise that pair bonded Cabrera voles suppress mate-finding scent-marking to reduce energetic costs and

predation risk. To test this hypothesis we compared scent-marking behaviour towards a clean substrate, in both paired and non-paired voles. No differences were found in the scent-mark sources and the amount of marks placed by voles in both conditions. We also analysed the scent-marking behaviour of both sex pair bonded voles when exposed simultaneously to a clean substrate, a substrate pre-marked by males and a substrate pre-marked by females. We found no significant differences in scent-marks (urine-marked area and number of faecal boli) across the three types of substrate types. In accordance with our prediction, these results suggest that pair bonded Cabrera voles did not use scent-marking for mate-finding.

Keywords: Behaviour Plasticity; *Microtus cabreræ*; Modulation; Pair bonding; Scent-marking; Voles

Introduction

The placement of semiochemicals on the substrate to communicate with conspecifics, defined as scent-marking, is a common trait among mammals (Johnson 1973). Scent-marking typically entails faeces deposition, urine and/or dragging a particular region of the body with scent producing glands (e.g. the anogenital region) on the substrate (Ferkin 2001; Ferkin and Johnston 1995; Eisenberg and Kleiman 1972), and seems to serve multiple and, occasionally, overlapping functions (Becker et al. 2012; Ferkin et al. 2004; Ferkin et al. 2001). Scent-marking is used mainly for territorial-defence, as well as mate-advertisement and self-advertisement (Johnston 1983; Thomas and Wolff 2002). Given the high costs of scent-marking for both scent-donors and receivers

(Gosling et al. 2000; Mason et al. 2005; Koivula and Korpimäki 2001; Hughes et al. 2010) it is not surprising that animals may modulate their scent-marking behaviour, reducing costs when scent-marking is not profitable (Roberts et al. 2001). Notwithstanding, the plasticity of mammals' scent-marking behaviour at species level is poorly studied. Only a few studies have focused on the intra-specific plasticity of scent-marking behaviour, showing that different social conditions could evoke distinct responses in terms of scent-marking (Becker et al. 2012; Le Roux et al. 2008). For instance, in yellow mongooses (*Cynictis penicillata*) the population density seems to affect the subordinates' intensity of territorial scent-marking, being intensive in high-density populations and almost absent in low density populations (Le Roux et al. 2008). Another study has shown that pair bonding affects scent-marking behaviour of California mouse males (*Peromyscus californicus*), which reduce their scent-marking towards unfamiliar females when paired-bonded (Becker et al. 2012).

In the current study we have investigated the scent-marking behaviour and function(s) in pair bonded Cabrera voles (*Microtus cabreræ* Thomas, 1906). The Cabrera vole is a rare rodent endemic from the Iberian Peninsula (Mira et al. 2008), which is presumably monogamous and where individuals seem to establish pair bonds with opposite-sex conspecifics, as suggested by several ecological evidence: (1) they form breeding pairs, with relatively high residence of over 10 months, where one male share the nest with one female and pups, not showing aggressive reactions to them (Fernandez-Salvador et al. 2001; Fernandez-Salvador 1998; Fernandez-Salvador et al. 2005); (2) they present a reduced sexual dimorphism in body dimensions and relatively small testis of adult males (Ventura et al. 1998), and (3) have been recently described a low inter-sexual variation of home-range sizes coupled with a high inter-sexual overlap (Pita et al. 2010). Non-paired Cabrera voles from both sexes seem to use scent-marking primarily to

increase the likelihood of finding a mate (Gomes et al. in press), by advertising their presence to the opposite-sex. Scent-marking as a mate finding strategy should have great value to non-paired individuals, but once established the so-called “monogamic breeding pairs” the value of the opposite-sex selective marking decreases as voles are no longer in progress of searching for a potential mate. Accordingly, we have hypothesized that pair bonded Cabrera voles may not use scent-marks for mate-advertisement. To disclose the influence of pair bonding on scent-marking behaviour, and assess the scent-marking function(s) in pair bonded Cabrera voles, we conducted two distinct assays. Firstly, we compared marking behaviour of both non-paired and pair bonded voles towards a clean substrate. In the subsequent assay, we assess the scent-marking behaviour in response to scent-marks from donors of each sex.

Methods

Study animals

We used wild-caught voles from southern Portugal (Gomes et al. in press). Once in captivity, voles were housed individually in glass cages (70 x 40 x 40 cm) without contact with conspecifics for at least 7 days (non-paired phase). After being tested as non-paired, each animal was pair-housed with a random selected opposite-sex individual in new cage (140 x 40 x 40 cm) (pair bonded phase, Becker et al. 2012). The voles were considered paired after 9 days since pairing procedure. House cages were prepared with soil and vegetation to mimic their original habitat, and kept in a room at 18 - 21°C under a long photoperiod (14:10 h, L:D). Food (diverse grass species collected daily supplemented with apples) and water were provided *ad libitum* (Fernandez-Salvador et al. 2001). All the procedures were done with the permission of

Portuguese governmental authorities (i.e. Institute for Nature and Biodiversity Conservation) and conformed to the guidelines approved by the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research (Gannon et al. 2007), and to the guidelines for the treatment of animals in behavioural research (ASAB 2006). Moreover, at the end of the experiments, the animals were released at the same location where they had been caught.

Experiment 1

The first experiment was carried out to test the differences in scent-marking among non-paired and pair bonded voles in response to a clean substrate. For both conditions, 15 adult males and 15 adult females were used. In each test, one individual was placed in a small glass arena (63 x 29.7 x 40 cm) with the bottom covered with a clean paper sheet (substrate); scent-mark behaviour was allowed for 30 min. Then, the individual was removed from the arena and returned to the respective home cage, and the substrate dried for 10 min. The dried substrate was then observed in a dark-room and scent-marks were identified and accounted under UV-light (Desjardins et al. 1973; Ferkin et al. 2001). Each mark was traced lightly with a pencil and then photographed with a 5 Mpx Digital Camera for assessment of scent-marked areas using Quantum-GIS software (QGis 2011). To prevent contamination with human scents disposable latex gloves were used to manipulate all substrates. Scent-marked substrates were stored in clean plastic pockets at -20 °C until use in the second experiment.

Experiment 2

The second experiment was carried out to assess the function of scent-marking in pair bonded Cabrera voles by investigating the scent-marking behaviour of each sex when exposed simultaneously to clean substrates, substrates previously scent-marked by males and substrates previously scent-marked by females.

The two pre-marked substrates, one from each sex, obtained from non-paired individuals in experiment 1 and an equal-size unmarked substrate (i.e. clean paper sheet) were placed side-by-side at the bottom of a glass arena (89.1 x 63 x 40 cm). In each replicate, one paired male or one paired female was placed in the centre of the arena inside a bottomless mesh cage for two minutes. Then, the cage was removed using a remote device to avoid visual contact with the observer allowing the specimen to scent-mark for 30 min. New marks in each test substrate (clean, female donor and male donor) were identified and analyzed following the procedure described in experiment 1. Overlapping areas between initial and secondary marks were identified and measured (Wolff et al. 2002; Johnston 1999; Ferkin and Pierce 2007); initial and secondary marks were distinguishable by the colour difference under UV-light. The experiment was replicated with 15 paired adults of each sex.

Data analysis

Wilcoxon signed-rank tests were used to compare scent-marking frequency (faecal boli) and area (total area marked with urine) over clean substrate between non-paired and paired condition (experiment 1). Secondary scent-marking data from each sex in experiment 2, i.e. faecal boli frequency and total urine area, were compared among the

three types of substrate (i.e., male pre-marked; female pre-marked; non pre-marked) using the Friedman's rank test.

To determine the occurrence of over-marking (Ferkin and Pierce 2007), the observed overlapping areas were compared with those expected randomly, for each combination (animal test sex: sex of initial marks donor) using Wilcoxon signed-rank tests. Expected overlapping areas were accounted by multiplying the proportion of substrate area occupied by the initial marks with the area of all the secondary marks placed over the same substrate (Gomes et al. in press).

All statistical procedures were performed using the statistical package PASW version 18 (SPSS for Windows 2009).

Results

Experiment 1

When exposed to clean substrate, no significant differences were observed in the number of faecal boli (Wilcoxon signed-rank test: $z = -0.12$, $n = 15$, $P = 0.906$) and urine marked area (Wilcoxon signed-rank test: $z = -0.28$, $n = 15$, $P = 0.776$) for males in both pairing conditions (Fig.1). A similar result was gathered for females (faecal boli: Wilcoxon signed-rank test: $z = -0.44$, $n = 15$, $P = 0.659$; urine marked area: Wilcoxon signed-rank test: $z = 0.17$, $n = 15$, $P = 0.865$; Fig. 1). No anogenital marks were detected.

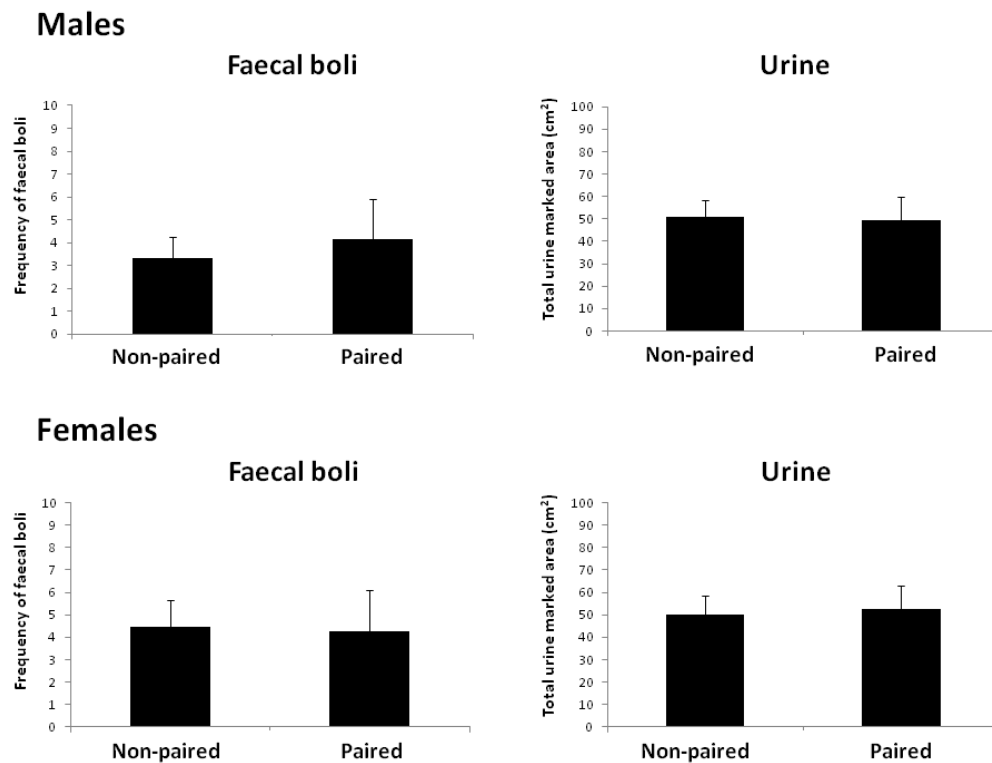


Fig. 1 Mean (\pm SE) number of faecal boli and total urine marked area produced over 30-minute trials by 15 females and 15 males over clean substrate, in both testing conditions (non-paired versus paired).

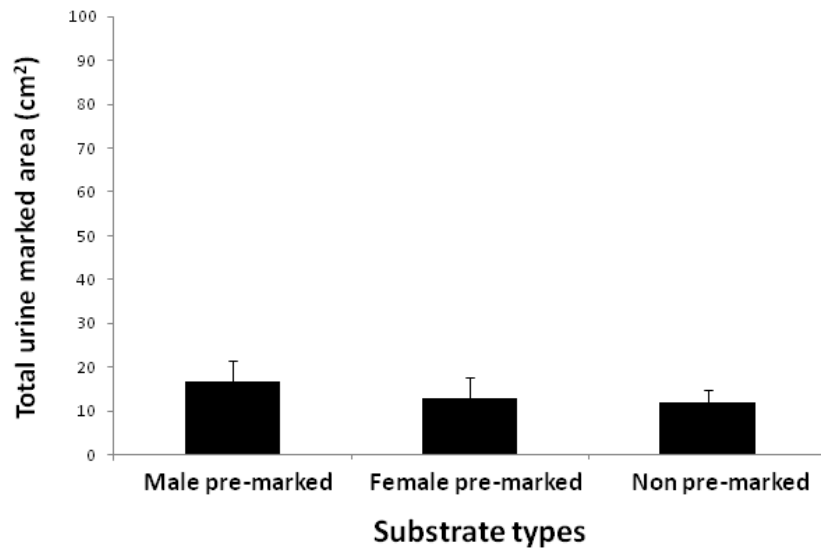
Experiment 2

Pair bonded males and females did not show a significant preference to scent-mark with urine a specific substrate type (males: Friedman test: $\chi^2 = 0.13$, d.f. = 2, $n = 15$, $P = 0.936$; females: Friedman test: $\chi^2 = 2.13$, d.f. = 2, $n = 15$, $P = 0.344$; Fig.2). Similarly, no significant differences were detected in the number of faecal boli placed across the three substrate type (males: Friedman test: $\chi^2 = 0.26$, d.f. = 2, $n = 15$, $P = 0.880$; females: Friedman test: $\chi^2 = 0.038$, d.f. = 2, $n = 15$, $P = 0.981$; Fig.3).

No overmarking was detected between pre-existent and secondary scent-marks (scent donor *vs.* test subject; males *vs.* males: Wilcoxon signed-rank test: $z = -0.73$, $n = 15$, $P =$

0.460; males vs. females, $z = 0.39$, $n = 15$, $P = 0.695$; females vs. males, $z = -1.59$, $n = 15$, $P = 0.112$; females vs. females, $z = 0.72$, $n = 15$, $P = 0.470$).

Males



Females

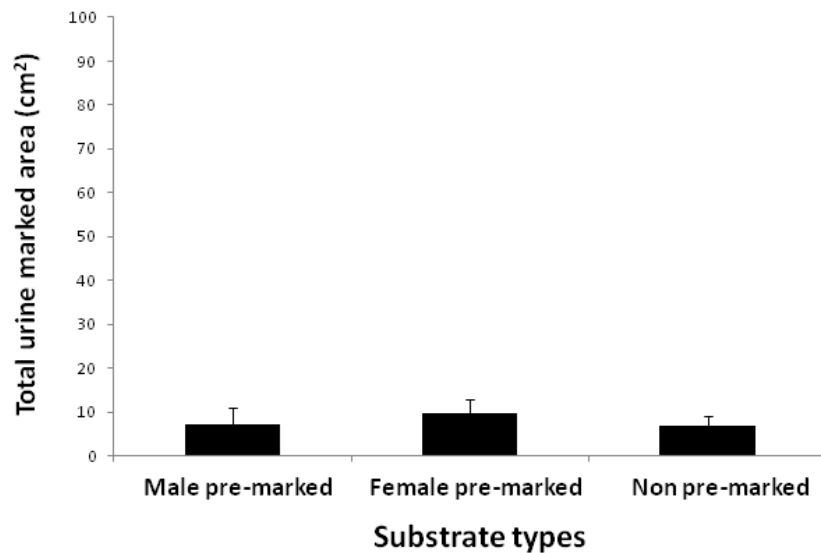
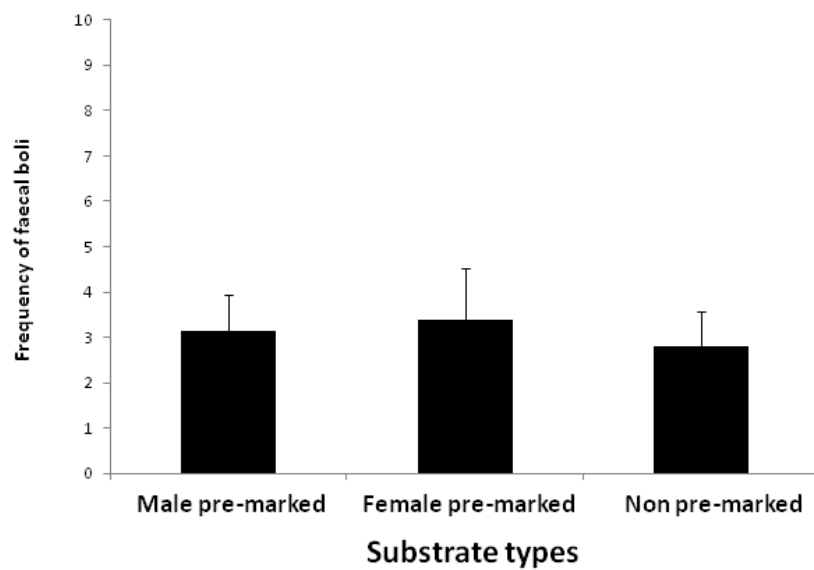


Fig. 2 Total area (mean \pm SE) of urine secondary scent-marks located over male pre-marked substrate, female pre-marked substrate and non-pre-marked substrate, for paired males ($n = 15$) and paired females ($n = 15$) in experiment 2.

Males



Females

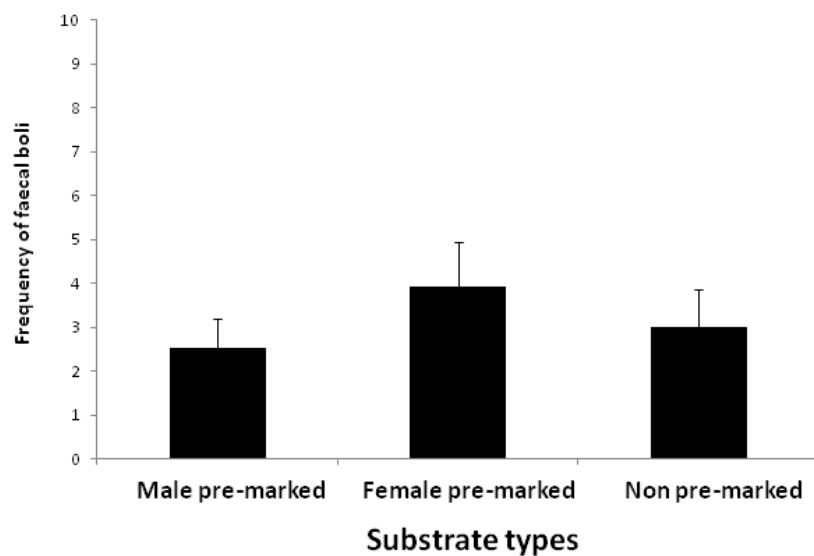


Fig. 3 Number of faecal boli (mean \pm SE) placed over male pre-marked substrate, female pre-marked substrate and non-pre-marked substrate, for paired males ($n = 15$) and paired females ($n = 15$) in experiment 2.

Discussion

The scent-marking behaviour is often associated with a strategy to attract or find mates, commonly, by counter or/and over-marking the marks of opposite-sex conspecifics (Ferkin et al. 2004; Ferkin et al. 2001; Ferkin and Pierce 2007; Gomes et al. in press). Both counter and over-marking the opposite-sex marks may be carried out to advertise individual presence, availability to mate and/or reveal interest in previous scent-donors, thus increasing the likelihood of finding a mate (Ferkin et al. 2004; Ferkin et al. 2001; Woodward et al. 2000; Hurst and Rich 1999). Furthermore, in some rodent species females increase their likelihood of mating with a “good quality” male by selectively counter-marking some male marks rather than others (Hurst and Rich 1999; Johnston 1999). The counter-marking of opposite-sex marks was documented in non-paired Cabrera voles, suggesting that they use scent-marks for mate-finding (Gomes et al. in press). However, in pair bonded voles the benefits provided by the scent-marking required for mate-finding function are lower or inexistent, since they have a stable relationship with an opposite-sex conspecific and usually do not breed outside the pair (Aragona and Wang 2004). In such situation it is likely that the high costs (e.g. energetic costs and predation risk) carried by scent-marking (Gosling et al. 2000; Mason et al. 2005; Koivula and Korpimäki 2001) largely overcome the benefits resulting in a selection against scent-marking to finding a mate. Thus, pair bonded voles may suppress their mate-finding scent-marking. Consistent with this idea, pair bonded Cabrera voles from both sexes marked with urine interchangeably among the different substrate types, without preferentially counter-marking or over-marking opposite-sex conspecifics’ marks. A recent study also supports this conjecture for male California mice, where male marking behaviour towards unfamiliar females was reduced in pair bonded males relatively to non-paired males (Becker et al. 2012). Furthermore,

concerning physiology, the association between pair bonding and scent-marking suggested by our results is not totally surprising, since arginine vasopressin (AVP), a neuropeptide found in most mammals, is implicated in scent-marking behavior regulation (Albers and Bamshad 1999; Goodson and Bass 2001; Ferris et al. 1984) and is simultaneously a critical mediator of partner-preference formation in pair bonding (Williams et al. 1994; Winslow et al. 1993; Cho et al. 1999; Cushing et al. 2001; Insel and Hulihan 1995; Young and Wang 2004; Goodson and Bass 2001).

Pair bonded voles usually show preferential contact with a familiar partner rather than unfamiliar ones (Williams et al. 1994; Carter et al. 1992; Carter et al. 1986; Williams et al. 1992). Besides the partner preference, pairing also leads to an increase in aggressive behaviour toward unfamiliar conspecifics (selective aggression) (Bowler et al. 2002; Wang et al. 1997; Winslow et al. 1993), that serves to guard mate and territory (Carter and Getz 1993). Scent-marks provide a physical evidence of dominance and are commonly used to delineate territorial limits and to intimidate or deter conspecific intruders (Gosling 1982; Hurst 1993; Brown and McDonald 1985; Roberts and Dunbar 2000). Pair bonded voles may use scent-marking to defend the territory and their investment in mates and offspring by counter and/or over-marking same-sex scent-marks (Humphries et al. 1999; Hurst 1990; Wolff 1993; Johnston et al. 1997; Johnston et al. 1995). However, our results failed to support the territorial defence hypothesis on pair bonded Cabrera voles, since voles did not preferentially counter or over-marked with urine the substrate scent-marked by same-sex conspecifics. In fact, our results do not support any of the classical hypotheses for the use of scent-marking on voles, because pair bonded voles also did not avoid overlapping urine marks of other individuals, suggesting no scent-blending avoidance strategy required for the self-advertising function (Thomas and Kaczmarek 2002; Thomas and Wolff 2002; Gomes et

al. in press). Likely, the reason why unpaired and pair bonded voles do not use scent-marking for territorial defence and self-advertising functions is the same. As we proposed previously for non-paired individuals, the patchy and highly-fragmented distribution of Cabrera voles, wherein encounters between conspecifics are rare, makes scent-marking for both territorial defence and self-advertisement functions useless (Gomes et al. in press).

In conclusion, the current findings provide evidence of intra-specific plasticity of Cabrera voles' scent-marking behaviour related with pair-cohabitation. The differences verified on scent-marking response to the opposite-sex marks between paired and non-paired voles of both sexes suggest that pair bonding may phase out their investment towards finding a new mate, particularly in mate-advertisement strategies. Despite these differences, pair bonding did not affect any other studied aspect of scent-marking behaviour. Cabrera voles do not appear to use scent-marking for any of the most usually considered functions, however that does not exclude its use for other communication purposes. Perhaps, there may be other functions that we are unable to identify with the present paradigm.

Acknowledgments

This study was funded by the Portuguese Foundation for Science and Technology through a PhD grant awarded to LG (SFRH / BD / 23699 / 2005). Further support was provided by a grant awarded to LG by the University of Évora – Programa Bento de Jesus Caraça. Capture and handling of voles were conducted with the permission of the Portuguese nature conservation authority (ICNB). We are also grateful to Professor Alfredo Pereira for providing the rooms where the work was carried out.

Bibliography

- Albers HE, Bamshad M (1999) Role of vasopressin and oxytocin in the control of social behavior in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). In: Urban I, Burbach J, De Wied D (eds) Progress in Brain Research, vol Volume 119. Elsevier, pp 395-408
- Aragona BJ, Wang Z (2004) The prairie vole (*Microtus ochrogaster*): an animal model for behavioral neuroendocrine research on pair bonding. *Harv J* 45 (1):35-45
- ASAB (2006) Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. *Anim Behav* 71:245-253
- Becker EA, Petrino S, Marler CA (2012) A comparison of scent marking between a monogamous and promiscuous Species of *Peromyscus*: pair bonded males do not advertise to novel females. *Plos One* 7 (2):e32002.
doi:10.1371/journal.pone.0032002
- Bowler CM, Cushing BS, Carter CS (2002) Social factors regulate female-female aggression and affiliation in prairie voles. *Physiol Behav* 76 (4-5):559-566
- Brown RE, McDonald DW (1985) Social odours in mammals, vol 1 & 2. Brown, R. E. McDonald, D. W. edn. Clarendon Press, Oxford
- Carter CS, Getz LL (1993) Monogamy and the prairie vole. *Sci Am* 268 (6):100-106
- Carter CS, Getz LL, Cohen-Parsons M (1986) Relationships between social organization and behavioral endocrinology in a monogamous mammal. In: Rosenblatt J, Busnel C, Beer C, Slater J (eds) Advances in the Study of Behavior, vol Volume 16. Academic Press, pp 109-145
- Carter CS, Williams JR, Witt DM, Insel TR (1992) Oxytocin and social bonding. *Ann Ny Acad Sci* 652 (1):204-211. doi:10.1111/j.1749-6632.1992.tb34356.x

- Cho MM, DeVries AC, Williams JR, Carter CS (1999) The effects of oxytocin and vasopressin on partner preferences in male and female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). Behav Neurosci 113 (5):1071-1079
- Cushing BS, Martin JO, Young LJ, Carter CS (2001) The effects of peptides on partner preference formation are predicted by habitat in prairie voles. Horm Behav 39 (1):48-58. doi:10.1006/hbeh.2000.1633
- Desjardins C, Maruniak JA, Bronson FH (1973) Social rank in house mice: differentiation revealed by ultraviolet visualization of urinary marking patterns. Science 182 (4115):939-941
- Eisenberg JF, Kleiman DG (1972) Olfactory communication in mammals. Annu Rev Ecol Syst 3:1-32
- Ferkin MH (2001) Patterns of sexually distinct scents in *Microtus spp.* Can J Zool 79 (9):1621-1625
- Ferkin MH, Johnston RE (1995) Meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, use multiple sources of scent for sex recognition. Anim Behav 49 (1):37-44
- Ferkin MH, Li HZ, Leonard ST (2004) Meadow voles and prairie voles differ in the percentage of conspecific marks they over-mark. Acta Ethol 7 (1):1-7
- Ferkin MH, Mech SG, Paz-Y-Mino G (2001) Scent marking in meadow voles and prairie voles: a test of three hypotheses. Behaviour 138:1319-1336
- Ferkin MH, Pierce AA (2007) Perspectives on over-marking: is it good to be on top? J Ethol 25 (2):107-116
- Fernandez-Salvador R (1998) Topillo de cabrera, *Microtus cabreræ* Thomas, 1906. Galemys 10 (2):5-18

- Fernandez-Salvador R, Garcia-Perea R, Ventura J (2001) Reproduction and postnatal growth of the cabrera vole, *Microtus cabrerae*, in captivity. *Can J Zool* 79 (11):2080-2085
- Fernandez-Salvador R, Ventura J, Garcia-Perea R (2005) Breeding patterns and demography of a population of the cabrera vole, *Microtus cabrerae*. *Anim Biol* 55 (2):147-161
- Ferris CF, Albers HE, Wesolowski SM, Goldman BD, Luman SE (1984) Vasopressin injected into the hypothalamus triggers a stereotypic behavior in golden hamsters. *Science* 224 (4648):521-523. doi:10.1126/science.6538700
- Gannon WL, Sikes RS, Mammalogists ACaUCotASo (2007) Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal* 88:809-823
- Gomes L, Mira A, Barata EN (in press) The role of scent-marking in patchy and highly-fragmented populations of the Cabrera vole (*Microtus cabrerae* Thomas, 1906). *Zool Sci*
- Goodson JL, Bass AH (2001) Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. *Brain Res Rev* 35 (3):246-265. doi:10.1016/s0165-0173(01)00043-1
- Gosling LM (1982) A reassessment of the function of scent marking in territories. *Z Tierpsychol* 60 (2):89-118
- Gosling LM, Roberts SC, Thornton EA, Andrew MJ (2000) Life history costs of olfactory status signalling in mice. *Behav Ecol Sociobiol* 48 (4):328-332
- Hughes NK, Price CJ, Banks PB (2010) Predators are attracted to the olfactory signals of prey. *Plos One* 5 (9):e13114. doi:10.1371/journal.pone.0013114

- Humphries RE, Robertson DHL, Beynon RJ, Hurst JL (1999) Unravelling the chemical basis of competitive scent marking in house mice. *Anim Behav* 58:1177-1190
- Hurst J, Rich TJ (1999) Scent marks as competitive signals of mate quality. In: Johnson RE, Muller-Schwarze D, Sorensen P (eds) *Advances in Chemical Communication in Vertebrates*. Plenum Press, New York, pp 209-226
- Hurst JL (1990) Urine marking in populations of wild house mice *Mus-Domesticus* Ratty .1. communication between males. *Anim Behav* 40:209-222
- Hurst JL (1993) The priming effects of urine substrate marks on interactions between male house mice, *Mus Musculus-Domesticus* Schwarz and Schwarz. *Anim Behav* 45 (1):55-81
- Insel TR, Hulihan TJ (1995) A gender-specific mechanism for pair bonding: oxytocin and partner preference formation in monogamous voles. *Behav Neurosci* 109 (4):782-789
- Johnson RE (1973) Scent marking in mammals. *Anim Behav* 21 (3):521-535.
doi:10.1016/s0003-3472(73)80012-0
- Johnston RE (1983) Chemical signals and reproductive behavior. In: Vandenberg JG (ed) *Pheromones and reproduction in mammals*. Academic Press., Orlando, pp 3-37
- Johnston RE (1999) Scent over-marking: how do hamsters know whose scent is on top and why should it matter. In: Johnston RE, Muller-Schwarze D, Sorenson PW (eds) *Advances in chemical signals in vertebrates*. Plenum Press, New York, pp 227-238
- Johnston RE, Munver R, Tung C (1995) Scent counter marks: selective memory for the top scent by golden hamsters. *Anim Behav* 49 (6):1435-1442. doi:Doi: 10.1016/0003-3472(95)90064-0

- Johnston RE, Sorokin ES, Ferkin MH (1997) Female voles discriminate males' over-marks and prefer top-scent males. *Anim Behav* 54:679-690
- Koivula M, Korpimäki E (2001) Do scent marks increase predation risk of microtine rodents? *Oikos* 95 (2):275-281
- Le Roux A, Cherry MI, Manser MB (2008) The effects of population density and sociality on scent marking in the yellow mongoose. *J Zool* 275 (1):33-40.
doi:10.1111/j.1469-7998.2007.00404.x
- Mason RT, LeMaster MP, Müller-Schwarze D (2005) Chemical signals in vertebrates 10. Springer,
- Mira A, Marques CC, Santos SM, Rosario IT, Mathias ML (2008) Environmental determinants of the distribution of the cabrera vole (*Microtus cabreræ*) in Portugal: Implications for conservation. *Mamm Biol* 73 (2):102-110.
doi:10.1016/j.mambio.2006.11.003
- Pita R, Mira A, Beja P (2010) Spatial segregation of two vole species (*Arvicola sapidus* and *Microtus cabreræ*) within habitat patches in a highly fragmented farmland landscape. *Eur J Wildlife Res* 56 (4):651-662. doi:10.1007/s10344-009-0360-6
- QGIS DT (2011) Quantum GIS geographic information system.
- Roberts SC, Dunbar RIM (2000) Female territoriality and the function of scent-marking in a monogamous antelope (*Oreotragus oreotragus*). *Behav Ecol Sociobiol* 47 (6):417-423. doi:10.1007/s002650050685
- Roberts SC, Gosling LM, Thornton EA, McClung J (2001) Scent-marking by male mice under the risk of predation. *Behav Ecol* 12 (6):698-705.
doi:10.1093/beheco/12.6.698
- SPSS for Windows 18. 2009. Chicago, IL: SPSS, Inc.

- Thomas SA, Kaczmarek BK (2002) Scent-marking behaviour by male prairie voles, *Microtus ochrogaster*, in response to the scent of opposite- and same-sex conspecifics. Behav Process 60 (1):27-33
- Thomas SA, Wolff JO (2002) Scent marking in voles: a reassessment of over marking, counter marking, and self-advertisement. Ethology 108 (1):51-62
- Ventura J, Lopez-Fuster MJ, Cabrera-Millet M (1998) The cabrera vole, *Microtus cabrerae*, in Spain: a biological and a morphometric approach. Neth J Zool 48 (1):83-100
- Wang Z, Hulihan TJ, Insel TR (1997) Sexual and social experience is associated with different patterns of behavior and neural activation in male prairie voles. Brain Res 767 (2):321-332
- Williams JR, Catania KC, Carter CS (1992) Development of partner preferences in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*): The role of social and sexual experience. Horm Behav 26 (3):339-349. doi:10.1016/0018-506x(92)90004-f
- Williams JR, Insel TR, Harbaugh CR, Carter CS (1994) Oxytocin administered centrally facilitates formation of a partner preference in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). J Neuroendocrinol 6 (3):247-250
- Winslow JT, Hastings N, Carter CS, Harbaugh CR, Insel TR (1993) A role for central vasopressin in pair bonding in monogamous prairie voles. Nature 365 (6446):545-548. doi:10.1038/365545a0
- Wolff JO (1993) Why are female small mammals territorial. Oikos 68 (2):364-370
- Wolff JO, Mech SG, Thomas SA (2002) Scent marking in female prairie voles: a test of alternative hypotheses. Ethology 108 (6):483-494

- Woodward RL, Bartos K, Ferkin MH (2000) Meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) and prairie voles (*M. ochrogaster*) differ in their responses to over-marks from opposite- and same-sex conspecifics. *Ethology* 106 (11):979-992
- Young LJ, Wang Z (2004) The neurobiology of pair bonding. *Nat Neurosci* 7 (10):1048-1054

CAPÍTULO 4

MARCAÇÃO DE ALARME DURANTE TENTATIVAS DE PREDACÃO NO RATO DE CABRERA

Alarm scent-marking during predatory attempts in the Cabrera vole
(*Microtus cabreræ* Thomas, 1906)

Publicado *On-line First* na *Ecological Research*

DOI: 10.1007/s11284-012-1023-8

CAPÍTULO 4. ALARM SCENT-MARKING DURING PREDATORY ATTEMPTS IN THE CABRERA VOLE (*MICROTUS CABRERAE* THOMAS, 1906)

Luis Alexandre Piteira Gomes ^{1,2}, Pedro Miguel Pedreirinho Salgado ², Eduardo Nuno Barata ³, António Paulo Pereira Mira ^{2,4}

¹ Grupo de Ecossistemas e Paisagens Mediterrânicas - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora - Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

² Unidade de Biologia da Conservação, Universidade de Évora - Núcleo da Mitra, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

³ Departamento de Biologia, Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

⁴ CIBIO - Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos - Pólo de Évora

Abstract

The alarm pheromones often released by animals under stressful situations seems to elicit behavioural changes in conspecifics, which in the appropriate context can be viewed as anti-predatory responses. However, the releasing of alarm pheromones associated with predatory events has not been demonstrated in mammals. In the current study with wild-caught Cabrera voles, we carried out experiments in the laboratory and in the field to assess the release of alarm pheromones in scent-marks during simulated

predatory events and disclose their effects on conspecifics. First we conducted an assay wherein voles were let to scent-mark a clean substrate in the absence of disturbance (control) and under the simulation of predatory events. Contrarily to the control, no faecal boli were released and the area marked with urine was significantly larger during the predatory simulation. In a subsequent assay, we assessed the voles' preference between urine-marks released under predatory simulation and in control conditions. Voles showed a significant preference by control substrates. Finally, a third assay was carried out in vole's habitat wherein the individual activity was monitored by radio-tracking before and after placement of urine-marks obtained during the conditions described above. The vole's activity was only reduced near the urine-marks released during the simulated predatory events. The results suggest that: (1) during predatory attempts Cabrera voles release an alarm pheromone in their urine-marks; (2) the putative alarm pheromone reduces voles' activity in the surroundings of the marked area; (3) the putative alarm pheromone persists in the field affecting conspecifics' activity.

Keywords: Alarm pheromone; Voles; *Microtus cabreræ*; Scent-marking; Predation; Anti-predatory.

Introduction

Many animals emit alarm signals in response to a stressful situation, particularly on the approach of predators or under a predatory attempt (Caro 2005; Wyatt 2003; Hollén and Radford 2009). These alarm signals may be directed to conspecifics in order to warn

them of an impending danger and promote anti-predatory responses and/or directed to predators in order to deter them or attract additional ones thus disrupting the predation event (Sherman 1985; Mathis and Smith 1992; Wyatt 2003; Caro 2005; Mathis et al. 1995). Often warning alarm signals evolution had been viewed as one of the most puzzling questions in behavioural ecology since alarm signalling has relative high cost to the signaller but no obvious direct benefits (Mathis et al. 1995; Taylor et al. 1990; Williams 1992, 1964). Nevertheless, some of these signals may have delayed benefits for signallers, such as saving the lives of individuals who will reciprocate in the future (Ashton et al. 1998; Trivers 1971), of potential mates (Witkin and Fitkin 1979) or other group members in circumstances where group living is beneficial (Smith 1986). Moreover, truly altruistic signals may have evolved in situations where the benefits fall on related individuals (Mathis et al. 1995; Sherman 1977; Wu et al. 2010).

The alarm signals may take many forms, being mostly visual, auditory or chemical. Some of the prey use chemical alarm signals to convey information to conspecifics about the location(s) of predation attempts. This information induces conspecifics' avoidance of those areas reducing the risk of predation, which increases individual and overall population fitness. Chemical alarm signals are left in areas where stressful events have occurred and are termed as alarm pheromones (*Schreckstoff*) (Kikusui et al. 2001; Abel 1991; Abel and Bilitzke 1990; Cocke et al. 1993; Zalaquett and Thiessen 1991). Alarm pheromones are seemingly widespread in the animal kingdom (Rottman and Snowdon 1972; Wilson 1975; Chen et al. 2006; Ackerl et al. 2002; Mathis and Smith 1993; Lawrence and Smith 1989; Brown et al. 2004; Moser et al. 1968; Blum 1969; Hews 1988; Hrbáček 1950; Halpern 1992) and, among mammals, they have been studied in domestic pigs (Vieuille-Thomas and Signoret 1992), cattle (Boissy et al. 1998), rats (Abel 1991; Abel 1993; Abel and Bilitzke 1990; Hauser et al. 2008; Valenta

and Rigby 1968; Kikusui et al. 2001) and laboratory mice (Zalaquett and Thiessen 1991). In rodents, alarm pheromones induce avoidance of the scent-marked area (Mackay-Sim and Laing 1980; Rottman and Snowdon 1972; Carr et al. 1970; Zalaquett and Thiessen 1991), freezing behaviour (Kikusui et al. 2001; Hauser et al. 2005), decreased resting behaviour (Kikusui et al. 2001; Kiyokawa et al. 2004a), and promote hiding and risk-assessment behaviours (Kiyokawa et al. 2006).

Most, if not all, studies of alarm pheromones in mammals have been carried out with domestic/laboratory strains living in laboratory-conditioned environments, such as Wistar rats (Kiyokawa et al. 2004b; Kiyokawa et al. 2006; Gutierrez-Garcia et al. 2007; Hauser et al. 2008; Kikusui et al. 2001), male Sprague-Dawley rats (Abel 1993), BALB/cJ mice (Zalaquett and Thiessen 1991), Aubrac cattle (Boissy et al. 1998) and domestic pigs (Vieuille-Thomas and Signoret 1992). To our knowledge, no free-ranging mammals from wild species living in natural environments were evaluated till now. Domestication and other artificial selection processes commonly entail intentional or unintentional changes in animal physiology and behaviour repertoire, becoming poorly secure to infer behavioural traits of wild species of mammals (Price 1999; Smith et al. 1994). Thus, information about the release of putative alarm pheromones and its effects in naturally occurring species are actually missing. Moreover, in studies using lab-strain rodents or other domesticated mammals the stressor stimuli most commonly used are foot-shocks (Gutierrez-Garcia et al. 2007; Mackay-Sim and Laing 1980; Kikusui et al. 2001), force-to-swim (Abel 1993), and other artificial aversive stimulation paradigms (Hauser et al. 2008) which lack adaptive value, since it is unlikely that such stimuli occur naturally. Stimuli that induce the release of alarm pheromones in domestic/laboratory mammals do not match common naturally occurring stress stimuli like experiencing a predatory attempt. This raises questions about the role of predation

events in releasing of alarm pheromones and how these substances affect the behaviour of conspecific receivers.

Casual observations during live-trap sessions of Cabrera voles (*Microtus cabreræ*, Thomas, 1906), such as an apparent avoidance of traps where voles had been caught previously, suggested the release of a putative alarm pheromone. The Cabrera vole is a rare microtine, endemic from the Iberian Peninsula with a highly fragmented population (Mira et al. 2008; Palomo and Gisbert 2002). It is an habitat specialist that lives in areas associated with humid tall herb communities (Fernandez-Salvador 1998; Santos et al. 2005; Santos et al. 2007), which are relatively rare and marginal, and occur as rather isolated patches (Pita et al. 2006). Like other rodent species, scent-marking with urine seems to mediate the reproductive behaviour of the Cabrera vole (Gomes et al., submitted), however, the release of a putative alarm pheromone has not been investigated. In Cabrera voles, an alarm pheromone is likely of high value to reduce predation risk due to the small size (< 0.2 ha) of suitable habitat patches (Pita et al. 2007) that may favour predators.

The objective of the current study was to test the existence of alarm signals released by Cabrera voles that may warn conspecifics about a predatory risk. This study was focused in scents that are commonly considered as being the more resilient in the releasing site, i.e. those placed over the substrate (scent-marks) in contrast with more volatile substances that are released to the air (Hauser et al. 2008; Kikusui et al. 2001). Three experiments were carried out to: (1) attest changes in scent-marking induced by a simulated predatory attempt; (2) verify voles' preference between scent-marks released during the simulated predatory attempt and those released in the absence of such

stressful event; (3) evaluate the effect of alarm scents on conspecific voles in their natural habitat.

We focused our study only to determine if Cabrera voles release alarm pheromones in their scent-marks under a predatory attempt, to warn conspecifics. Other hypotheses for the evolution of alarm pheromones, including predation deterrent function (Mathis and Smith 1992; Wyatt 2003; Mathis et al. 1995) are not incompatible with the conspecific alarm function, but are not addressed in our study.

General Methods

The animals used in this study were adults (body weight > 28 g, (Fernandez-Salvador et al. 2005b; Fernandez-Salvador et al. 2005a) wild-caught Cabrera voles from southern Portugal. Voles were caught using Sherman live traps (7 × 23 × 9 cm) baited with apple and supplied with hay and hydrophobic cotton for bedding (Pita et al. 2010). Traps were placed at likely capture sites which were assessed by checking eaten apple trials left in the area during the previous 2–4 days, and then the traps were checked every 8h. Pregnant females were identified by abdominal palpation and released in their habitat.

Prior to the experiments in the laboratory, the captured voles were housed individually in glass cages (70 x 40 x 40 cm) containing soil and vegetation to mimic their original habitat. The cages were kept in a room at 18 - 21 °C with a long photoperiod (14:10 h, L:D). Food (several grass species collected daily supplemented with apples) and water were provided *ad libitum* (Fernandez-Salvador et al. 2001).

All the procedures were approved by Portuguese governmental authorities, Institute for Nature and Biodiversity Conservation and conformed to the guidelines approved by the

American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research (Gannon et al. 2007), and to the guidelines for the treatment of animals in behavioural research (ASAB 2006). At the end of the experiments all animals were returned to the same location where they were caught.

Experiment 1

The first essay was carried out to assess changes in scent-marking behaviour induced by a simulated predatory attempt. Firstly, one female or one male was placed in a small glass arena (63 x 29 x 40 cm) with a clean paper sheet (substrate) on the bottom, and scent-marking was allowed for 30 min. Then, the vole was removed to the respective home cage, the substrate was allowed to dry for 10 min, and then was observed in a dark-room to identify scent-marks (i.e. urine, faeces and anogenital marks) and trace them with a pencil under UV-light (Desjardins et al. 1973). The area marked with urine was assessed by overlaying a transparency film with a grid of 7308 squares (0.25 cm^2 each); all the squares that covered at least 50 % of the urine marks were accounted for estimation of the marked area. The scent-marked substrates were stored in clean plastic pockets at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use in the second experiment (see below). After at least 24 h the same procedure was carried out with the same individual, but now exposed to a predatory event stimuli (here after referred as PES) for 30 min: simultaneous exposure to (1) playback calls of the tawny owl (*Strix aluco*) alternated with calls of the barn owl (*Tyto alba*) at 5 min intervals (Hendrie et al. 1998; Eilam et al. 1999); (2) visual access to a domestic cat in a cage placed next the arena (Figueiredo et al. 2003); (3) simulation of capture during one minute at the beginning of the test, which was repeated two more times at 10 min intervals; during the last capture simulation the observer wearing gloves

captured the vole and released it immediately after. The substrates were then analysed for type and extension of scent-marks as described above. The experiment was replicated with 20 adult voles of each sex. To prevent contamination with human scents disposable latex gloves were used to manipulate all substrates.

Experiment 2

The second essay was carried out to assess the preference of Cabrera voles between substrates with urine-marks of conspecifics exposed to PES and substrates with urine-marks of conspecifics released during the non-stress condition (here after referred as NS condition); the substrates used in this essay were obtained during experiment 1 (see above) and the choice test was done with the substrates scent-marked by the same vole during the NS and PES events. To prevent the effect of different scent-marked areas between the two type of substrates, five squared sections (one cm² each) of scent-marked areas (after thawed each substrate for 30 min at room temperature) were cut-off from each type of scent-marked substrate and glued on top of two clean paper sheets (each 63 x 29.7 cm), respectively, as shown in figure 1. These scent-marked substrates were placed on the bottom of a glass arena (89.1 x 63 x 40 cm; Fig. 1) with an equal-size clean paper sheet between them. In each replicate one vole was placed in the centre of the arena inside a bottomless mesh cage for two minutes; then the cage was removed using a remote device to avoid visual contact with the observer allowing the animal to move freely inside the arena for 30 min. The vole's behaviour was recorded on video for subsequent analysis; the behavioural data collected were the voles' first choices (which scent-marked substrate was chosen after removing the habituation cage) and time spent over each of the two substrate types (NS condition vs. PES). The experiment

was replicated with 20 adult voles of each sex; half of each sex individuals were tested with the same sex scent-marked substrate and the other half were tested with opposite sex scent-marked substrate.

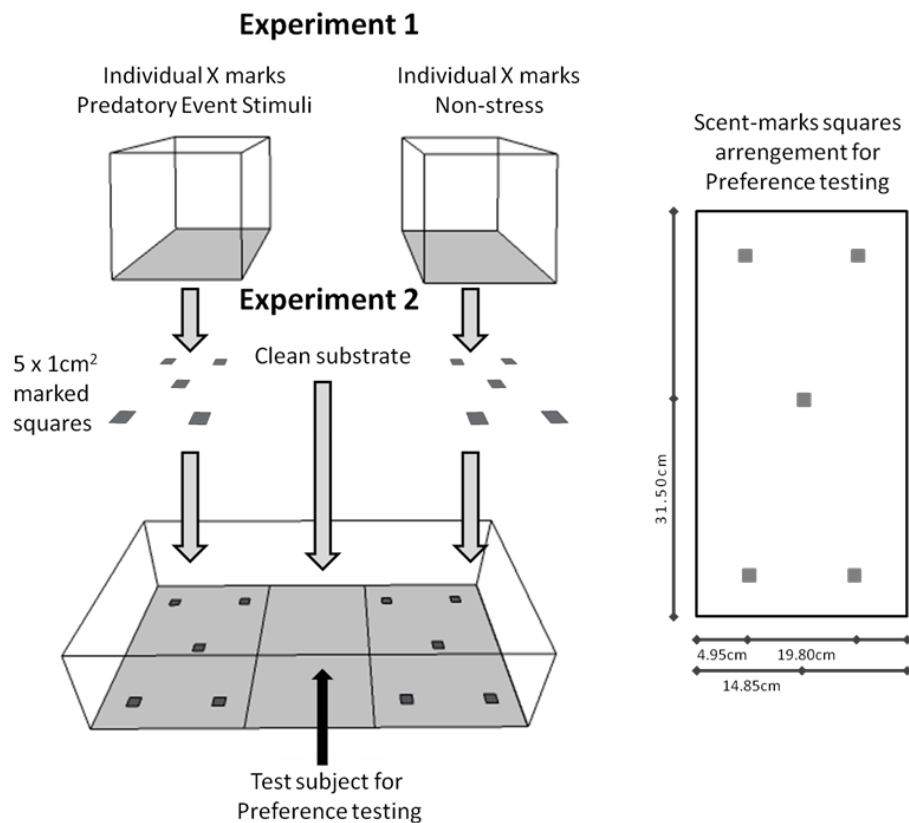


Fig 1 Diagram illustrating how Cabrera voles' scent marks collected during experiment 1 were placed on the substrates for the preference test in the experiment 2. Clean paper-sheets substrates were initially marked by both sexes for 30 minutes (experiment 1). Five 1 cm² squares of scent-marked areas were cut-off and placed on clean paper-sheets substrates that, in turn, were placed in a larger arena wherein experiment 2 was carried out. On the right, top view of the location of the scent-marks samples on clean substrates.

Experiment 3

The third experiment was carried out in the field to assess the effects of alarm scents on conspecific voles in wild conditions.

The normal activity pattern of 10 animals (5 males and 5 females) was accessed by radio-tracking. Adult voles were caught within suitable habitat patches and were fitted with radio-transmitter collars (Wildlife Materials, Inc., Murphysboro, IL, USA); the collar added only up to 5% of the vole's weight, thus avoiding significant additional energetic costs to the animals. The voles were lightly sedated with a subcutaneous injection of Dormitor® (0.2 mg/kg) to reduce handling stress, and after the placement of the transmitter collars an equivalent dose of Antisedam® was administered to reverse the anaesthesia effect. Before release, collared animals were kept in a cage and observed for at least two hours to ensure that they were suffering no ill effects or loss of mobility (Pita et al. 2010). Radio-tracking started at least four hours after traps removal and the release of animals at their point of capture (Gray et al. 1998; Pita et al. 2010).

Radio-tracking schedule consisted in six different intervals of four hours covering a complete 24 h cycle (0000-0345; 0400-0745; 0800-1145; 1200-1545; 1600-1945; 2000-2345). These intervals were alternatively surveyed for each animal, starting each one at least eight hours after the previous session. Each session consisted in registering individual's location at 15-min intervals, totalling 16 fixes recorded per animal per session (Pita et al. 2010). Voles were located by homing and multiple triangulations using a TRX-100S receiver and three-element yagi antenna (Wildlife Materials, Inc., Murphysboro, IL, USA) (Pita et al. 2010). Each location was recorded using a GPS equipment that typically yielded an error of three meters. Active/inactive animal condition was registered by fluctuation vs. stationary radio-signal (Pita et al. 2010).

Tracking was carried out during 12 sessions of four hours to obtain two complete 24 h cycles.

All the information about the location of each vole was included in a GIS database. A Kernel density function was used to identify higher activity areas (here after referred as “HiA”), based on 75 % utilization contour. The threshold of 75 % utilization contour was preferred to the 50 %, typically used in core activity areas identification, since the core areas expected for Cabrera voles were too small (mean = 55.1 m², Pita et al. 2010) to carry out subsequent experimental procedures. Smoothing parameters were determined by least squares cross-validation (LSCV). To reduce a potential LSCV non-convergence due to identical or spatially close locations, we used only the active locations (Hemson et al. 2005; Pita et al. 2010). HiA size ranged between 120.3 and 698.1 m² (mean \pm SE = 259.57 \pm 54.34). Inside each vole’s HiA five points were randomly selected (here after called ‘experimental points’) for the placement of previously collected scents (see below). In each experimental point we placed randomly the following stimuli: (1) PES urine-marks of a male; (2) NS urine-marks of the same male; (3) PES urine-marks of a female; (4) NS urine-marks of the same female; (5) no urine-marked substrate as control. The placement of stimuli in each experimental point was carried out using a custom-built structure: an half-section PVC pipe covering a plasticized metallic mesh envelope on top of which was placed the scent-marked substrate; this structure was meant to attenuate possible rain/humidity negative influence on the persistence of the urine scent-marks. PES and NS scent-marks were obtained as in experiment 1 except that the bottom of the arena was covered with a clean transparent plastic film. Immediately after removing the vole from the arena, urine scent-marks placed in ca. 9 cm² of plastic film were removed with a clean cotton cosmetic pad which was then kept inside clean plastic tubes at -20 °C , until use.

Radio-tracking of the voles was resumed at least eight hours after placement of the scent-marks in the field and continued over two complete 24 h cycles. Then all the voles were re-captured to remove the radio-collars.

Data analysis

The total area scent-marked with urine in experiment 1 was compared between PES and NS conditions using the Wilcoxon signed-rank test. In addition, the total area covered with urine scent-marks during PES was compared between sexes using the Mann-Whitney U test. For the data of experiment 2, the total time spent on each substrate were analysed with the Wilcoxon signed-rank test, and first choices were examined with Chi-square tests. Cross-tabulation (Person's Chi-square) was used to analyse whether substrate first choice was independent of the vole's sex.

For experiment 3, the effect of the different stimuli on voles' activity was assessed by comparing the proportion of voles' active locations (after arcsine transformation) within a distance of four metres from the stimuli location point before and after stimuli placement with repeated-measures ANOVA. The threshold distance was defined taking into account the typical GPS error and minimum distance to others experimental points.

All statistical procedures were performed with PASW, version 18 (SPSS for Windows 2009).

Results

Experiment 1

When exposed to the NS condition, Cabrera voles only released urine and faeces marks; no anogenital marks were detected. Both sexes marked with urine a significant larger area when exposed to PES than in a NS situation (males, $z = 3.88$, $P < 0.001$; females, $z = 3.92$, $P < 0.001$; Fig. 2). No significant differences were observed in urine marked area between males ($610.09 \pm 66.86 \text{ cm}^2$) and females ($655.89 \pm 79.55 \text{ cm}^2$) when exposed to PES ($U = 186.00$, $P = 0.71$; Fig. 2). For both sexes, the number of faecal boli released was higher during the NS condition than during the PES (males, $z = -2.94$, $P < 0.01$; females, $z = -2.96$, $P < 0.01$; Fig. 2); no faecal boli were left on the substrate during the PES.

Experiment 2

Both sexes had a significant preference towards NS substrate, spending less time over PES substrate than over NS substrate (females, $z = -2.016$, $P < 0.05$; males, $z = -1.979$, $P < 0.05$; Fig. 3).

In the beginning of experiment 2 the first choice of 27 tested animals (13 males and 14 females) was to move towards the NS substrate, revealing a significant selection for this substrate condition ($\chi^2 = 4.90$, $df = 1$, $P < 0.05$, $n = 40$). Individuals first choice was independent from tested animal sex (Cross-tab Marked substrate first choice (FC) x Tested animal sex: Pearson's $\chi^2 = 0.11$, $df = 1$, $P = 0.736$, $n = 40$), scent-marks donor

sex (FC x Scent-mark donor sex: Pearson's $\chi^2 = 1.03$, $df = 1$, $P = 0.311$, $n = 40$) and from the scent-marks provided by same or by opposite sex donors (FC x Tested against scent-marks form same/opposite sex donors: Pearson's $\chi^2 = 1.03$, $df = 1$, $P = 0.311$, $n = 40$).

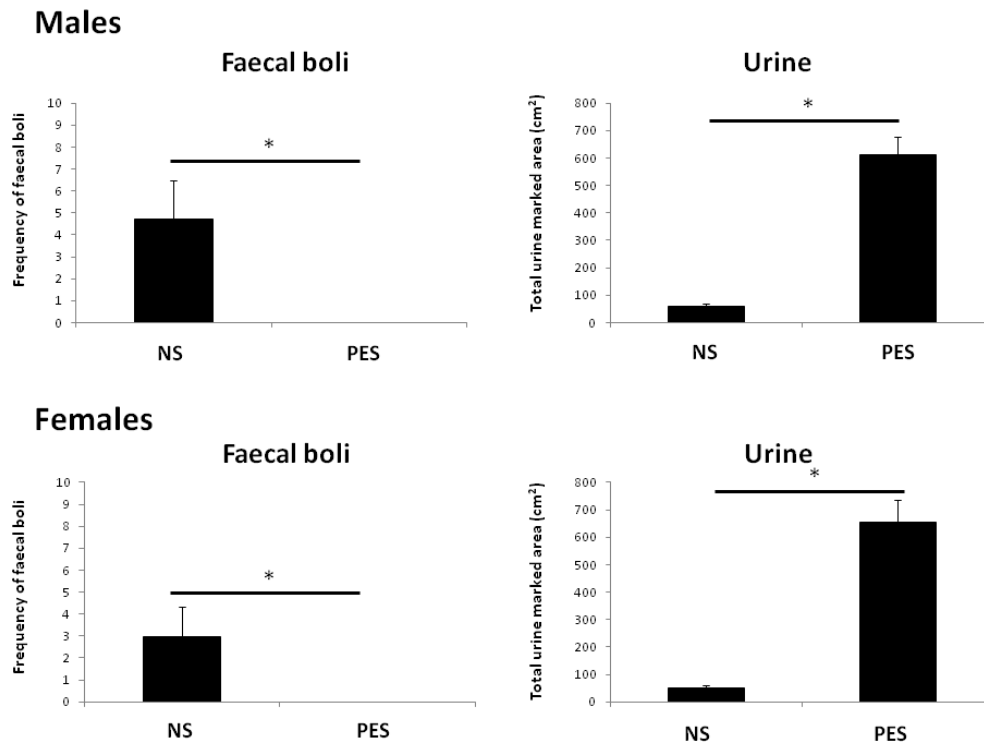


Fig. 2 Mean (\pm SE) number of faecal boli and urine-marked area placed by both sex individuals (20 females and 20 males) over clean substrate, in a small arena over 30 minutes trials, in a non-stress situation (NS) and exposed to predatory stress stimuli (PES). * Indicates significant differences between scent-marked areas ($P < 0.01$, Wilcoxon signed-rank test).

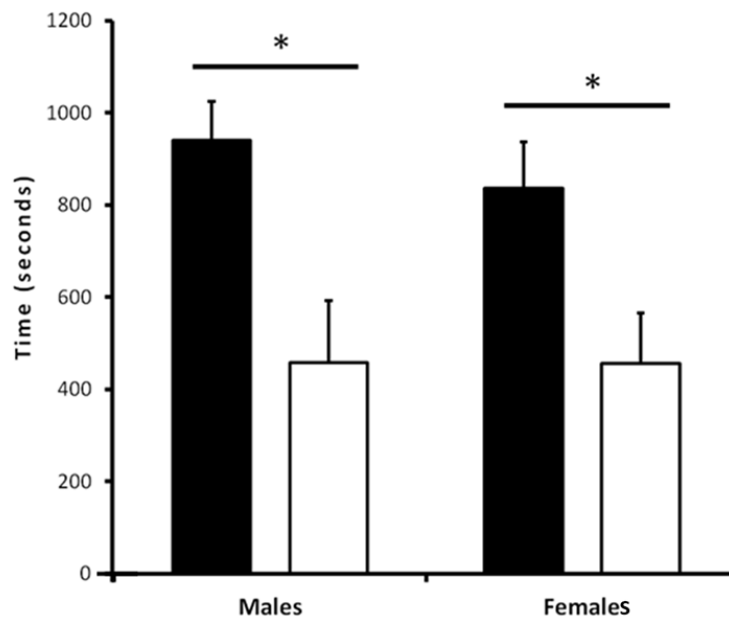


Fig. 3 Mean (\pm SE) time spent by Cabrera voles over NS substrates (black bars) and PES substrates (white bars) in the preference test (experiment 2). Both sexes spent significantly more time over NS substrates than over PES substrates. Significant differences between time spent over each substrate type marked by * for $P < 0.05$ (Wilcoxon signed-rank test).

Experiment 3

During Cabrera voles radio-tracking, we registered on average 87.90 active points before the treatment and 81.72 after. No significant differences were observed in the proportion of active locations near all control experimental points ($F_{1,9} = 0.62$, $P = 0.45$, $n = 10$; Fig. 4), neither near any NS scent-marks experimental points (male NS, $F_{1,9} = 0.40$, $P = 0.54$, $n = 10$; female NS, $F_{1,9} = 1.47$, $P = 0.26$, $n = 10$; Fig. 4) before and after treatment. The proportions of active points before and after the treatment were nearly

significant for PES condition experimental points (male PES, $F_{1,9} = 4.75$, $P = 0.05$, $n = 10$; female PES, $F_{1,9} = 3.49$, $P = 0.09$, $n = 10$; Fig. 4).

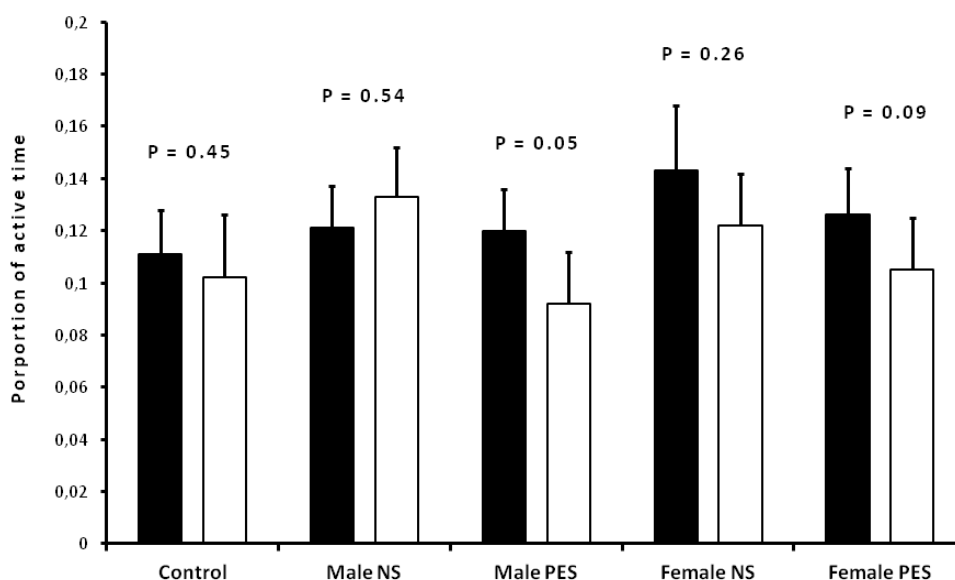


Fig. 4 Mean (\pm SE) proportion of active time spent by Cabrera voles near field experimental points with different scent-marks before (black bars) and after (white bars) placement of the scent-marked substrates (experiment 3): cotton without scent-marks as Control; Male NS and Male PES were from the same male donors; Female NS and female PES were from the same female donors. P-values from repeated-measures ANOVA.

Discussion

The results of our first experiment suggest that urine is the single source of a putative alarm pheromone in Cabrera voles, since no other type of scent-marks were left on the substrate by voles exposed to a simulation of a predatory event. Studies on rats (Mackaysim and Laing 1981; Kiyokawa et al. 2004a; Gutierrez-Garcia et al. 2007) and

female pigs (Vieuille-Thomas and Signoret 1992), showed that the urine of individuals that had been exposed to a stressful situation induced avoidance of the urinated area by conspecifics. Under anxiety/stress conditions, increased urination is a common behaviour (Ramos and Mormède 1997) and our results conform with this pattern, since increased urination was observed in voles exposed to the simulation of a predatory event.

Faeces seem not to be a source of a putative alarm pheromone in Cabrera voles, which is in accordance with an earlier study carried out with rats where the alarm substances were not present in faeces but only in the urine and body odours (Mackaysim and Laing 1981). The results of experiment 1 showed that voles only defecated in the non-stress condition, despite the reported association between increased defecation and stress (Taché et al. 2001). Anogenital scent-marks seem not to play any important role in transmitting aversive information in Cabrera voles, since such type of scent-marks were not observed. Several studies with Wistar rats have demonstrated the release of alarm substances from anal glands in the perianal region, however, these substances were not placed over the substrate but released to the surrounding air (Kikusui et al. 2001; Kiyokawa et al. 2004b, a, 2005; Kiyokawa et al. 2006). Thus, the results of our experiment cannot exclude the existence of putative volatile alarm substances in Cabrera voles, because we analysed only scent-marks left on the substrate.

In the preference tests (experiment 2), both sexes spent significantly less time over PES than over NS substrates and a significantly higher number of voles preferred to move towards NS than PES substrates upon release in the test arena. The vole's preference towards scent-marks released in a NS situation rather than those released under PES is a strong evidence that predatory-like stimuli induce the releasing of alarm substances in

vole's urine scent-marks to warn conspecifics for an impending danger. Studies with other rodents, using non-natural stressors have shown also the releasing of alarm substances that induce avoidance in conspecifics (Mackay-Sim and Laing 1980; Zalaquett and Thiessen 1991). Rats preferred areas previously occupied by conspecifics in comparison to clean areas, and such preference decreased with the presence of stress odours to an extent concordant with levels of stressor applied to the odour donors (Mackay-Sim and Laing 1980). Also, BALB/mice tend to sidestep areas associated with odours of stressed conspecifics (Zalaquett and Thiessen 1991). To our knowledge, the current study is the first that suggests a putative alarm pheromone associated with urine scent-marks of rodents that is released upon exposure to nature-like stressors mimicking stimuli associated with predators' proximity as occurs in nature.

In the field (experiment 3), voles of both sexes tended to reduce their activity in areas surrounding the PES urine scent-marks placed inside their home range, but did not avoid areas with no marks or marked with the urine of non-stressed voles. These results suggest that urine scent-marks released during a predatory event in the laboratory may influence voles' behaviour in the field. Despite the results being only nearly-significant probably due to the low sample sizes, a trend for a reduction of activity was observed, suggesting that voles which perceive the putative urine-related alarm pheromone may decrease the likelihood of being detected by a predator which supports the signal to conspecifics hypothesis. The detection of the putative alarm pheromone with subsequent reduction of activity in the surroundings of the marked area would enhance voles' ability to survive, increasing its fitness. Additionally, Cabrera voles are commonly found in breeding pairs with a high co-residence period (at least 10 months) during which the pairs share the nest and surrounding area with pups (Fernandez-Salvador et al. 2001; Fernandez-Salvador 1998; Fernandez-Salvador et al. 2005b);

placement of alarm scent-marks in response to a predation attempt by adult voles may induce avoidance of such areas by any forthcoming familiar group member and, thereby, increase the survival likelihood of direct kin (Creel 1990). Predation risk avoidance can also carry significant costs for the prey (Brown et al. 1999; Lima 1998; Lima and Dill 1990; Lind and Cresswell 2005; Preisser and Bolnick 2008) in terms of energy acquisition, fecundity and growth which ultimately may affect survival. However, in areas with a strong predation risk, such as the Cabrera vole's habitats the benefits of avoiding alarm scent-marked areas must surpass the potential costs.

In conclusion, the results support that Cabrera voles of both sexes release urine-related alarm substances upon exposure to simulated predatory-stress events; such putative alarm pheromone induces avoidance of the scent-marked areas by adults of both sexes. This feature might be extremely valuable for Cabrera voles allowing them to assess the predatory risk in a specific area based on the presence of alarm substances that seems to reduce their activity; this effect can be viewed as an anti-predatory response that increases the likelihood of survive (Kavaliers and Choleris 2001). However, despite the effects of alarm substances on conspecifics described above, further field studies are required to assess effect of alarm substances on the survival of familiar group members and on the fitness of the scent-mark donors.

Acknowledgments

This study was funded by the Portuguese Foundation for Science and Technology through a PhD grant awarded to LG (SFRH / BD / 23699 / 2005). Further support was provided by a grant awarded to LG by the University of Évora – Programa Bento de Jesus Caraça. Capture and handling of voles were conducted with the permission of

the Portuguese nature conservation authority (ICNB). We are grateful to Pedro Salgado for his assistance in field data collection. We are also grateful to Professor Alfredo Pereira for providing access to the space where the laboratory experiments were carried out.

Bibliography

- Abel EL (1991) Alarm substance emitted by rats in the forced-swim test is a low volatile pheromone. *Physiol Behav* 50 (4):723-727. doi:10.1016/0031-9384(91)90009-d
- Abel EL (1993) Physiological-effects of alarm chemosignal emitted during the forced swim test. *J Chem Ecol* 19 (12):2891-2901
- Abel EL, Bilitzke PJ (1990) A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiol Behav* 48 (2):233-239
- Ackerl K, Atzmueller M, Grammer K (2002) The scent of fear. *Neuroendocrinol Lett* 23 (2):79-84
- ASAB (2006) Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. *Anim Behav* 71:245-253
- Ashton MC, Paunonen SV, Helmes E, Jackson DN (1998) Kin altruism, reciprocal altruism, and the big five personality factors. *Evol Hum Behav* 19 (4):243-255. doi:10.1016/s1090-5138(98)00009-9
- Blum MS (1969) Alarm Pheromones. *Annu Rev Entomol* 14 (1):57-80. doi:doi:10.1146/annurev.en.14.010169.000421

- Boissy A, Terlouw C, Le Neindre P (1998) Presence of cues from stressed conspecifics increases reactivity to aversive events in cattle: evidence for the existence of alarm substances in urine. *Physiol Behav* 63 (4):489-495
- Brown GE, Poirier J, Adrian JC (2004) Assessment of local predation risk: the role of subthreshold concentrations of chemical alarm cues. *Behav Ecol* 15 (5):810-815. doi:10.1093/beheco/arh084
- Brown JS, Laundré JW, Gurung M, Laundre JW (1999) The ecology of fear: optimal foraging, game theory, and trophic interactions. *J Mammal* 80 (2). doi:10.2307/1383287
- Caro T (2005) Antipredator defenses in birds and mammals. University of Chicago Press,
- Carr WJ, Martorano RD, Krames L (1970) Responses of mice to odors associated with stress. *J Comp Physiol Psych* 71 (2, Part 1):223-228. doi:10.1037/h0029164
- Chen D, Katdare A, Lucas N (2006) Chemosignals of fear enhance cognitive performance in humans. *Chem Senses* 31 (5):415-423. doi:10.1093/chemse/bjj046
- Cocke R, Moynihan JA, Cohen N, Grota LJ, Ader R (1993) Exposure to conspecific alarm chemosignals alters immune-responses in balb/c mice. *Brain Behav immun* 7 (1):36-46
- Creel S (1990) How to measure inclusive fitness. *P R Soc London* 241 (1302):229-231. doi:10.1098/rspb.1990.0090
- Desjardins C, Maruniak JA, Bronson FH (1973) Social rank in house mice: differentiation revealed by ultraviolet visualization of urinary marking patterns. *Science* 182 (4115):939-941

- Eilam D, Dayan T, Ben-Eliyahu S, Schulman I, Shefer G, Hendrie CA (1999) Differential behavioural and hormonal responses of voles and spiny mice to owl calls. *Anim Behav* 58 (5):1085-1093
- Fernandez-Salvador R (1998) Topillo de cabrera, *Microtus cabrerae* Thomas, 1906. *Galemys* 10 (2):5-18
- Fernandez-Salvador R, Garcia-Perea R, Ventura J (2001) Reproduction and postnatal growth of the cabrera vole, *Microtus cabrerae*, in captivity. *Can J Zool* 79 (11):2080-2085
- Fernandez-Salvador R, Garcia-Perea R, Ventura J (2005a) Effect of climatic fluctuations on body mass of a mediterranean vole, *Microtus cabrerae*. *Mamm Biol* 70 (2):73-83
- Fernandez-Salvador R, Ventura J, Garcia-Perea R (2005b) Breeding patterns and demography of a population of the cabrera vole, *Microtus cabrerae*. *Anim Biol* 55 (2):147-161
- Figueiredo HF, Bodie BL, Tauchi M, Dolgas CM, Herman JP (2003) Stress integration after acute and chronic predator stress: Differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* 144 (12):5249-5258
- Gannon WL, Sikes RS, Mammalogists ACaUCotASo (2007) Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal* 88:809-823
- Gray SJ, Hurst JL, Stidworthy R, Smith J, Preston R, MacDougall R (1998) Microhabitat and spatial dispersion of the grassland mouse (*Mus spretus* Lataste). *J Zool* 246:299-308

- Gutierrez-Garcia AG, Contreras CM, Mendoza-Lopez MR, Garcia-Barradas O, Cruz-Sanchez S (2007) Urine from stressed rats increases immobility in receptor rats forced to swim: Role of 2-heptanone. *Physiol Behav* 91 (1):166-172
- Halpern M (1992) Nasal chemical senses in reptiles: structure and function. In: Gans C, Crews D (eds) *Biology of the reptilia, physiology E, hormones, brain, and behavior*, vol 18. 2nd edn. University of Chicago Press, Chicago pp 423-523
- Hauser R, Marczak M, Karaszewski B, Wiergowski M, Kaliszan M, Penkowski M, Kernbach-Wighton G, Jankowski Z, Namiesnik J (2008) A preliminary study for identifying olfactory markers of fear in the rat. *Lab Anim* 37 (2):76-80
- Hauser R, Wiergowski M, Marczak M, Karaszewski B, Wodniak-Ochocinska L (2005) Alarm pheromones as an exponent of emotional state shortly before death - Science fiction or a new challenge? *Forensic SciInt* 155 (2-3):226-230
- Hemson G, Johnson PJ, South A, Kenward RE, Ripley R, Macdonald D (2005) Are kernels the mustard? Data from global positioning system (GPS) collars suggests problems for kernel home-range analyses with least-squares cross-validation. *J Anim Ecol* 74 (3):455-463. doi:10.1111/j.1365-2656.2005.00944.x
- Hendrie CA, Weiss SM, Eilam D (1998) Behavioural response of wild rodents to the calls of an owl: a comparative study. *J Zool* 245 (04):439-446. doi:doi:10.1017/S0952836998008073
- Hews DK (1988) Alarm response in larval western toads, *Bufo boreas*: release of larval chemicals by a natural predator and its effect on predator capture efficiency. *Anim Behav* 36 (1):125-133. doi:10.1016/s0003-3472(88)80255-0
- Hollén LI, Radford AN (2009) The development of alarm call behaviour in mammals and birds. *Anim Behav* 78 (4):791-800. doi:10.1016/j.anbehav.2009.07.021

- Hrbáček J (1950) On the flight reaction of tadpoles of the common toad caused by chemical substances. *Cell Mol Life Sci* 6 (3):100-102. doi:10.1007/bf02153372
- Kavaliers M, Choleris E (2001) Antipredator responses and defensive behavior: ecological and ethological approaches for the neurosciences. *Neurosci Biobehav R* 25 (7–8):577-586. doi:10.1016/s0149-7634(01)00042-2
- Kikusui T, Takigami S, Takeuchi Y, Mori Y (2001) Alarm pheromone enhances stress-induced hyperthermia in rats. *Physiol Behav* 72 (1-2):45-50
- Kiyokawa Y, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2004a) Alarm pheromones with different functions are released from different regions of the body surface of male rats. *Chem Senses* 29 (1):35-40. doi:10.1093/chemse/bjh004
- Kiyokawa Y, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2004b) Modulatory role of testosterone in alarm pheromone release by male rats. *Horm Behav* 45 (2):122-127
- Kiyokawa Y, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2005) Alarm pheromone that aggravates stress-induced hyperthermia is soluble in water. *Chem Senses* 30:513-519
- Kiyokawa Y, Shimozuru M, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2006) Alarm pheromone increases defensive and risk assessment behaviors in male rats. *Physiol Behav* 87 (2):383-387
- Lawrence B, Smith R (1989) Behavioral response of solitary fathead minnows, *Pimephales promelas*, to alarm substance. *J Chem Ecol* 15 (1):209-219. doi:10.1007/bf02027783
- Lima SL (1998) Stress and decision making under the risk of predation: recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. In: A. P. Møller MMP, J. B. Slater (ed) *ADV STUD BEHAV*, vol Volume 27. Academic Press, pp 215-290

- Lima SL, Dill LM (1990) Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Can J Zool* 68 (4):619-640. doi:10.1139/z90-092
- Lind J, Cresswell W (2005) Determining the fitness consequences of antipredation behavior. *Behav Ecol* 16 (5):945-956. doi:10.1093/beheco/ari075
- Mackay-Sim A, Laing DG (1980) Discrimination of odors from stressed rats by non-stressed rats. *Physiol Behav* 24 (4):699-704. doi:10.1016/0031-9384(80)90400-x
- Mackaysim A, Laing DG (1981) The sources of odors from stressed rats. *Physiol Behav* 27 (3):511-513
- Mathis A, Chivers DP, Smith R (1995) Chemical alarm signals: predator deterrents or predator attractants? *Am Nat* 145 (6):994-1005
- Mathis A, Smith RJ (1993) Chemical alarm signals increase the survival time of fathead minnows (*Pimephales promelas*) during encounters with northern pike (*Esox Lucius*). *Behav Ecol* 4 (3):260-265. doi:10.1093/beheco/4.3.260
- Mathis A, Smith RJF (1992) Avoidance of areas marked with a chemical alarm substance by fathead minnows (*Pimephales promelas*) in a natural habitat. *Can J Zool* 70:1473-1476
- Mira A, Marques CC, Santos SM, Rosario IT, Mathias ML (2008) Environmental determinants of the distribution of the cabrera vole (*Microtus cabrerae*) in Portugal: Implications for conservation. *Mamm Biol* 73 (2):102-110. doi:10.1016/j.mambio.2006.11.003
- Moser JC, Brownlee RC, Silverstein R (1968) Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. *J Insect Physiol* 14 (4):529-535. doi:10.1016/0022-1910(68)90068-1
- Palomo LJ, Gisbert J (2002) Atlas de los mamíferos terrestres de España. . Dirección general de conservación de la naturaleza - SECEM - SECEMU, Madrid

- Pita R, Beja P, Mira A (2007) Spatial population structure of the cabrera vole in Mediterranean farmland: The relative role of patch and matrix effects. *Biol Conserv* 134 (3):383-392
- Pita R, Mira A, Beja P (2006) Conserving the cabrera vole, *Microtus cabreræ*, in intensively used mediterranean landscapes. *Agr Ecosyst Environ* 115 (1-4):1-5
- Pita R, Mira A, Beja P (2010) Spatial segregation of two vole species (*Arvicola sapidus* and *Microtus cabreræ*) within habitat patches in a highly fragmented farmland landscape. *Eur J Wildlife Res* 56 (4):651-662. doi:10.1007/s10344-009-0360-6
- Preisser EL, Bolnick DI (2008) The Many Faces of Fear: Comparing the Pathways and Impacts of Nonconsumptive Predator Effects on Prey Populations. *Plos One* 3 (6):e2465. doi:10.1371/journal.pone.0002465
- Price EO (1999) Behavioral development in animals undergoing domestication. *App Anim Behav Sci* 65 (3):245-271
- Ramos A, Mormède P (1997) Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav R* 22 (1):33-57. doi:10.1016/s0149-7634(97)00001-8
- Rottman SJ, Snowdon CT (1972) Demonstration and analysis of an alarm pheromone in mice. *J Comp Physiol Psych* 81 (3):483-490
- Santos SM, Do Rosario IT, Mathias ML (2005) Microhabitat preference of the cabrera vole in a mediterranean cork oak woodland of southern Portugal. *Vie Milieu* 55 (1):53-59
- Santos SM, Mathias MDL, Mira A, Simoes MP (2007) Vegetation structure and composition of road verge and meadow sites colonized by cabrera vole (*Microtus Cabreræ* Thomas). *Pol J Ecol* 55 (3):481-493

- Sherman PW (1977) Nepotism and the evolution of alarm calls. *Science* 197 (4310):1246-1253. doi:10.1126/science.197.4310.1246
- Sherman PW (1985) Alarm calls of belding's ground squirrels to aerial predators: nepotism or self-preservation? *Behav Ecol Sociobiol* 17 (4):313-323. doi:10.1007/bf00293209
- Smith J, Hurst JL, Barnard CJ (1994) Comparing behaviour in wild and laboratory strains of the house mouse: Levels of comparison and functional inference. *Behav Process* 32 (1):79-86. doi:10.1016/0376-6357(94)90029-9
- Smith RJF (1986) Evolution of alarm signals: role of benefits of retaining group members or territorial neighbors. *Am Nat* 128:604-610
- SPSS for Windows 18. 2009. Chicago, IL: SPSS, Inc.
- Taché Y, Martinez V, Million M, Wang LW (2001) III. Stress-related alterations of gut motor function: role of brain corticotropin-releasing factor receptors. *Am J Physiol* 280 (2):G173-G177
- Taylor RJ, Balph DF, Balph MH (1990) The evolution of alarm calling: a cost-benefit analysis. *Anim Behav* 39 (5):860-868. doi:10.1016/s0003-3472(05)80950-9
- Trivers RL (1971) The evolution of reciprocal altruism. *Q Rev Biol* 46 (1):35-57
- Valenta JG, Rigby MK (1968) Discrimination of the odor of stressed rats. *Science* 161 (3841):599-601
- Vieuille-Thomas C, Signoret JP (1992) Pheromonal transmission of an aversive experience in domestic pig. *J Chem Ecol* 18 (9):1551-1557
- Williams GC (1964) Measurement of consociation among fishes and comments on the evolution of schooling. Michigan State Univ., Museum,
- Williams GC (1992) Natural selection: domains, levels, and challenges. Oxford University Press,

- Wilson EO (1975) Enemy specification in the alarm-recruitment system of an ant. Science 190 (4216):798-800. doi:10.1126/science.1198097
- Witkin SR, Fitkin MS (1979) Chickadee alarm calls: does mate investment pay dividends? Anim Behav 27:1275-1276
- Wu G-M, Boivin G, Brodeur J, Giraldeau L-A, Outreman Y (2010) Altruistic defence behaviours in aphids. BMC Evol Biol 10 (1):1-10. doi:10.1186/1471-2148-10-19
- Wyatt TD (2003) Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste. Cambridge University Press,
- Zalaquett C, Thiessen D (1991) The effects of odors from stressed mice on conspecific behavior. Physiol Behav 50 (1):221-227

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO GERAL

CAPÍTULO 5. DISCUSSÃO GERAL

O estudo da marcação odorífera, dos comportamentos associados e das funções inerentes, não é apenas importante na descoberta de estratégias e mecanismos que se precipitarão em novas teorias relativamente a comunicação química dos animais, ela é também de extrema importância para perceber a ecologia das espécies (Gorman 1990) e a sua sociobiologia (Hurst and Beynon 2008). Adicionalmente, nos últimos anos com o advento de uma nova área científica - “comportamento e conservação” (Daniel and Fernández-Juricic 2010; Berger-Tal et al. 2011)- têm-se vindo a perceber que o conhecimento relativamente à comunicação química, e particularmente à marcação odorífera, pode desempenhar um papel relevante na conservação de espécies ameaçadas (Swaigood 2007; Linklater 2004; Campbell-Palmer and Rosell 2011).

Como primeiro estudo acerca do comportamento de marcação odorífera no rato de Cabrera, os resultados deste trabalho fornecem um conjunto de informações relevantes acerca desta espécie ameaçada cuja biologia apenas nos últimos anos tem vindo a ser estudada com maior profundidade (e.g. Luque-Larena and Lopez 2007; Mira et al. 2008; Pita et al. 2010; Pita et al. 2011; Rosario et al. 2008; Santos et al. 2007; Pita et al. 2006). Atendendo ao facto de algumas populações de rato de Cabrera estarem em declínio (Fernandes et al. 2008; Pita et al. 2007), espera-se que o conhecimento produzido nesta tese seja mais um contributo para compreensão da sua biologia, numa área, a etologia, que tem sido menos explorada, mas que pode fornecer pistas importantes para incrementar o sucesso de ações de conservação, nomeadamente

quando envolvem translocações ou visam a reprodução em cativeiro para futuras reintroduções na natureza (Campbell-Palmer and Rosell 2011).

5.1. RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

5.1.1. O PAPEL DA MARCAÇÃO ODORÍFERA EM POPULAÇÕES EXTREMAMENTE FRAGMENTADAS DE RATO DE CABRERA

Os resultados deste estudo (**Capítulo 2**) mostraram que o rato de Cabrera, à semelhança de congêneres seus (Ferkin et al. 2004; Ferkin et al. 2001) e de outros roedores (Becker et al. 2012), usa a marcação odorífera com a função de aumentar a probabilidade de encontrar um parceiro para acasalar, direcionando as suas marcas de urina para zonas previamente marcadas por conspecíficos do sexo oposto. No entanto, ao contrário de outras espécies de roedores com as quais partilha um sistema de acasalamento monogâmico (Becker et al. 2012; Ferkin et al. 2004; Ferkin et al. 2001; Thomas and Kaczmarek 2002; Thomas and Wolff 2002), este não usa a marcação odorífera para defesa territorial ou para anunciar a sua presença/passagem indiferenciadamente a todos os conspecíficos. Os resultados sugerem ainda que apenas a urina desempenha um papel na comunicação intersexual, ao contrário de outras espécies congêneres que presumivelmente usam mais do que um tipo de marca (Ferkin et al. 1994; Ferkin and Johnston 1995; Ferkin 2001; Wolff et al. 2002). As diferenças evidenciadas por esta espécie relativamente às outras, podem estar relacionadas com a

especificidade das suas populações, particularmente com a diminuta densidade populacional e elevada fragmentação.

5.1.2. O EFEITO DO VÍNCULO DE CASAL NA MARCAÇÃO ODORÍFERA DO RATO DE CABRERA.

A marcação odorífera acarreta custos bastante elevados (Gosling and Roberts 2001; Gosling et al. 2000; Roberts 2007; Mason et al. 2005; Koivula and Korpimäki 2001; Hughes et al. 2010), pelo que é possível que o rato de Cabrera module o seu comportamento de marcação de modo a reduzir os custos nas situações em que esta não confere benefícios significativos. Os resultados mostram (**Capítulo 3**) que o vínculo de casal parece suprimir a marcação odorífera associada à função de aumentar a probabilidade de acasalamento, o que sugere a existência de plasticidade intraespecífica do comportamento de marcação associada ao vínculo de casal. Contrariamente ao que a informação existente acerca do comportamento de animais ligados por o vínculo de casal poderia levar a crer (Bowler et al. 2002; Wang et al. 1997; Winslow et al. 1993; Carter and Getz 1993), este parece não induzir a marcação para defesa territorial no rato de Cabrera.

5.1.3. MARCAÇÃO DE ALARME DURANTE TENTATIVAS DE PREDACÃO NO RATO DE CABRERA

Os ratos de Cabrera de ambos os sexos parecem libertar feromonas de alarme nas suas marcas odoríferas durante tentativas de predação (**Capítulo 4**). Comprovámos em laboratório que as áreas marcadas por ratos de Cabrera sujeitos à simulação de predação são preteridas, por conspecíficos de ambos os sexos, relativamente a áreas marcadas pelos mesmos animais na ausência deste *stress*. Em meio natural a presença destas feromonas de alarme parece contribuir para a redução da atividade dos conspecíficos na envolvência da área marcada, o que sugere que estes semioquímicos poderão ter um papel preponderante na sobrevivência de conspecíficos ao informar acerca de um risco de predação elevado. A existência de feromonas de alarme nas marcas odoríferas de urina não é completamente inusitada (Vieuille-Thomas and Signoret 1992; Boissy et al. 1998; Mackaysim and Laing 1981; Gutierrez-Garcia et al. 2007; Kiyokawa et al. 2004), contudo esta é a primeira vez que se prova que estas têm real valor adaptativo ao serem detetadas em animais silvestres sujeitos a tentativas de predação, e que têm efeito sobre conspecíficos no seu habitat natural.

5.2. RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS NO PANORAMA ATUAL DA MARCAÇÃO ODORÍFERA

A marcação odorífera é ubíqua entre os roedores, sendo vital para sua sobrevivência e/ou *fitness*, e simultaneamente bastante onerosa para os animais que as usam (Gosling et al. 2000; Mason et al. 2005; Koivula and Korpimäki 2001; Hughes et al. 2010). Devido ao seu elevado custo, as marcas apenas são usadas quando realmente concedem benefícios significativos (Roberts and Gosling 2001; Gosling and Roberts 2001; Roberts et al. 2001; Roberts 2012). Assim, é natural que a marcação odorífera e os comportamentos a ela associados reflitam as especificidades ecológicas (Gorman 1990) e sociobiológicas (Hurst and Beynon 2008) de cada espécie. É expectável que as diferenças interespecíficas relativamente a características populacionais, como a densidade e a fragmentação, tenham consequências sobre o comportamento de marcação odorífera, no entanto a grande maioria dos estudos em marcação odorífera de espécies silvestres foram realizados com espécies generalistas amplamente difundidas, que ocupam frequentemente territórios contíguos (Ferkin et al. 2004; Thomas and Wolff 2002; Wolff et al. 2002; Hurst and Beynon 2004; Getz et al. 2005; Madison and McShea 1987; Getz and Carter 1996). De facto, este estudo (**Capítulo 2**) parece ser o primeiro estudo detalhado acerca da marcação odorífera numa espécie de roedor cujas populações se apresentam bastante fragmentadas e cujas densidades populacionais são baixas. Os resultados deste estudo são relevantes porque sustentam que a fragmentação das populações associada às baixas densidades pode condicionar a utilização da marcação odorífera com funções específicas, nomeadamente para defesa do território e

para anúncio indiferenciado da presença/passagem. Contrariamente a outros *Microtus* cujas populações são relativamente mais densas e se distribuem de forma contígua, o rato de Cabrera parece não usar a marcação odorífera com estas duas finalidades, o que se deve provavelmente ao facto de em situações de baixa densidade e elevada fragmentação, onde a frequência de encontro entre conspecíficos e a intensidade intrasexual é relativamente baixa, os custos da marcação associada a estas funções ultrapassarem largamente os benefícios proporcionados.

A maioria dos estudos em marcação odorífera em roedores foi realizada com animais criados e mantidos em cativeiro (e.g. (Ferkin et al. 2004; Ferkin et al. 2001; Wolff et al. 2002; Thomas and Kaczmarek 2002; Thomas and Wolff 2002; Becker et al. 2012; Johnston and Bullock 2001). O ambiente em que os animais são criados e as suas experiencias prévias contribuem de forma preponderante para moldar o seu comportamento (Huntingford 2004; Margulis et al. 2005; Laviola and Terranova 1998; Caldji et al. 2000; Salvanes et al. 2007). De facto, os animais criados em cativeiro encontram condições distintas dos seus homólogos que vivem na natureza, sendo que em cativeiro a disponibilidade de recursos e de abrigo é distinta, são protegidos contra predadores, a socialização é limitada, e na maioria dos casos os animais não seleccionam os seus parceiros sexuais (Young 2008; Boersma et al. 2008; Epp and Gabor 2008), o que pode promover, por exemplo, alterações na capacidade de reconhecimento de predadores, procura de alimento e do comportamento reprodutivo (Kelley et al. 2006; Azevedo and Young 2006; Lee and Berejikian 2008; Orlov et al. 2006). Apesar de algumas diferenças comportamentais entre os animais em cativeiro e os que estão em liberdade apenas se verificarem após a manutenção de diversas gerações em cativeiro (McPhee 2003a; MCPhee 2003b), existem também diferenças comportamentais que

decorrem apenas das diferentes experiências a que os animais estiveram sujeitos durante a sua vida (Margulis et al. 2005; Laviola and Terranova 1998; Caldji et al. 2000; Salvanes et al. 2007). Este estudo, é um dos poucos estudos em marcação odorífera a ser desenvolvido com animais adultos capturados diretamente do seu habitat natural, de forma a assegurar que os comportamentos verificados representam o mais fielmente possível os comportamentos do rato de Cabrera em liberdade, nas condições ecológicas em que se encontra (**Capítulo 2 e 3**), e não são fruto de estímulos artificiais que incidiram sobre os animais durante a fase inicial da sua vida ou de qualquer outra influência provocada pelo cativeiro. De uma forma geral os animais usados nestes testes estiveram retidos em cativeiro por um período máximo de aproximadamente um mês.

A utilização de animais de uma espécie silvestre, como o rato de Cabrera, provenientes diretamente da natureza foi ainda mais relevante no caso específico do estudo de feromonas de alarme em marcas odoríferas (**Capítulo 4**). Isto porque, até agora a grande maioria dos estudos em que se comprovou a emissão de feromonas de alarme em mamíferos foi realizado em animais de laboratório ou em animais domesticados, os quais apresentam provavelmente um repertório comportamental bastante distinto das espécies de que são originários (ver introdução geral). De facto, os resultados deste estudo são dos poucos que permitem conjecturar com confiança a emissão de feromonas de alarme em espécies de roedores silvestres durante um evento de predação, visto também ser dos poucos estudos, senão os únicos, em que os estímulos promotores da emissão destas feromonas são estímulos realmente associados a um evento de predação.

Os resultados do estudo acerca das feromonas de alarme (**Capítulo 4**) são ainda, tanto quanto nos apercebemos, dos poucos que até à atualidade demonstram que as feromonas

de alarme emitidas por mamíferos têm um efeito significativo sobre os conspecíficos no meio natural. A maioria dos estudos conhecidos em marcação odorífera tem sido realizada em laboratório, sendo que são extremamente eficazes na investigação de aspetos específicos deste fenómeno (Wolff 2003). No entanto, frequentemente, os estudos realizados em condições naturais têm mostrado resultados contraditórios relativamente ao que os estudos em ambiente laboratorial haviam sugerido (Mahady and Wolff 2002; de la Maza et al. 1999; Wolff 2003, 2004), levantando a questão da eficácia dos testes laboratoriais para inferir acerca da ocorrência de um determinado fenómeno em populações naturais. Segundo Wolff (2003) devem-se realizar testes em condições naturais para validar os resultados obtidos no laboratório, porque apenas nestes testes se pode saber acerca da verdadeira existência de um fenómeno na natureza e/ou testar as consequências ecológicas e evolutivas do mesmo.

5.3. CONSTRANGIMENTOS E INVESTIGAÇÃO FUTURA

Os resultados desta tese abriram algumas portas para estudos futuros em marcação odorífera, particularmente em áreas como a relação entre marcação odorífera e as características populacionais, e a influência da marcação de alarme no uso do espaço. A argumentação subjacente à interpretação e discussão dos resultados centrou-se no balanço entre os custos comumente associados à marcação odorífera e aos benefícios em termos de *fitness* proporcionados pela mesma. No entanto, estas dinâmicas não foram realmente testadas relativamente à marcação odorífera do rato de Cabrera, sendo pertinente que no futuro se faça a validação das assunções resultantes desta pesquisa. De facto, desde o início da última década que a falta de estudos focados em determinar com

rigor as consequências em termos de custos e benefícios dos variados tipos de marcação odorífera é umas das grandes lacunas apontada ao panorama da pesquisa em comunicação química de mamíferos (Wolff 2003; Campbell-Palmer and Rosell 2011; Wolff and Sherman 2007). Apenas com este tipo de estudos se consegue deslindar o valor adaptativo de um determinado tipo de marcação odorífera que evolutivamente justifique a sua existência como forma de comunicação entre conspecíficos.

Na situação particular da marcação para aumentar a probabilidade de acasalar (**Capítulo 2**), dever-se-á confirmar se a contramarcação das marcas do sexo oposto trás benefícios reais para os animais que a realizam, e determinar quais os mecanismos subjacentes a esses benefícios. Por exemplo, a realização de testes em semicativeiro com animais associados e animais não associados à contramarcação sistemática do sexo oposto, mediante a manipulação artificial das suas marcas odoríferas, para determinar os efeitos desta na atração de animais do sexo oposto e/ou no seu sucesso de acasalamento, poderá ajudar a determinar a existência de *fitness* adicional proporcionado por esta marcação. Simultaneamente, e em função da escassez de estudos relativos aos custos energéticos efetivos dos diferentes tipos de marcação, poder-se-ão analisar os custos associados a esta marcação através da análise comparativa de variáveis como o peso corporal e taxa de crescimento (Gosling et al. 2000) em animais envolvidos em diferentes frequências de contramarcação, induzidas, por exemplo, pela exposição a diferentes frequências de marcas do sexo oposto. Apenas após o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pelo aumento da probabilidade de acasalamento associada a esta forma de marcação, a pesquisa poderá passar pela identificação das feromonas envolvidas em tais mecanismos.

Dada a plasticidade intraespecífica verificada relativamente ao comportamento de marcação em algumas espécies de roedores (ver introdução geral), e particularmente no rato de Cabrera (**Capítulo 3**), levanta-se a questão se as diferenças encontradas entre a marcação social desta espécie e da sua congénere americana, o *Microtus ochrogaster*, como resultado das diferenças nas condições populacionais (**Capítulo 4**), têm cariz evolutivo ou serão resultado da plasticidade intraespecífica deste comportamento. De facto os nossos resultados não fornecem nenhuma pista que possa ajudar a responder a esta questão, sendo que esta poderá ser a questão central de estudos futuros. Por exemplo, poderão estudar-se as funções sociais da marcação odorífera na mesma espécie fazendo variar as características sociais/populacionais, para avaliar a plasticidade intraespecífica da marcação odorífera, e verificar se em termos populacionais existem limiares que determinam a utilização da marcação odorífera para as diferentes funções.

Relativamente à supressão da marcação odorífera com a função de aumentar a probabilidade de acasalamento em ratos de Cabrera ligados pelo vínculo de casal (**Capítulo 3**), existe a necessidade de validar estes resultados em ambiente natural. Adicionalmente, testes comparativos em semicativeiro com o intuito de avaliar as consequências (i.e. custos e benefícios) desta forma de marcação em animais ligados pelo vínculo de casal poderiam ajudar a corroborar as vantagens evolutivas da supressão deste comportamento sugerida nesta tese. Devido ao facto dos resultados obtidos não sustentarem nenhuma das funções testadas à luz do paradigma usado, é necessária a formulação de um novo enquadramento teórico para a função das marcas odoríferas em animais ligados por vínculo de casal em espécies extremamente fragmentadas com baixas densidades populacionais.

Tendo-se constatado a libertação de feromonas de alarme nas marcas odoríferas de ratos de Cabrera durante uma tentativa de predação (**Capítulo 4**), a pesquisa acerca da duração do seu efeito sobre o comportamento de conspecíficos em habitat natural é pertinente para ajudar a perceber as suas consequências efetivas. Em função da elevada durabilidade da generalidade das marcas odoríferas (ver introdução geral) é de esperar que o efeito das marcas de alarme seja igualmente elevado. A acumulação diferencial destas ao longo do habitat poderá fornecer uma informação adicional acerca da pressão predatória, que pode também ter um papel na modulação do comportamento de conspecíficos. Não menos importante do que o estudo dos mecanismos responsáveis pelo valor adaptativo das marcas de alarme, é a identificação das moléculas envolvidas nesses mecanismos. Por exemplo, as pesquisas futuras relativamente às marcas odoríferas do rato de Cabrera deverão incluir a identificação química das feromonas de alarme libertadas na urina durante os eventos de predação, informação que não existe até a atualidade relativamente a qualquer outra espécie de mamífero (Hauser et al. 2005). De facto pouco se sabe acerca dos compostos químicos que atuam como feromonas de alarme em mamíferos, sendo que a únicas feromonas de alarme identificadas são as produzidas por insetos e peixes (Hauser et al. 2005; Verheggen et al. 2010).

Tendo em conta o acima exposto, julgamos que a presente tese, ao demonstrar a plasticidade e especificidade da marcação odorífera em função dos diferentes contextos sociais e populacionais, é inovadora e abre portas para todo um novo leque de pesquisas multidisciplinares onde ecólogos e etólogos se juntem com o objetivo comum de esclarecer as relações entre estas duas áreas.

5.4. REFERÊNCIAS

- Azevedo CSd, Young RJ (2006) Behavioural responses of captive-born greater rheas *Rhea americana* Linnaeus (Rheiformes, Rheidae) submitted to antipredator training. *Rev Bras Zool* 23:186-193
- Becker EA, Petrino S, Marler CA (2012) A comparison of scent marking between a monogamous and promiscuous Species of *Peromyscus*: pair bonded males do not advertise to novel females. *Plos One* 7 (2):e32002. doi:10.1371/journal.pone.0032002
- Berger-Tal O, Polak T, Oron A, Lubin Y, Kotler BP, Saltz D (2011) Integrating animal behavior and conservation biology: a conceptual framework. *Behav Ecol* 22 (2):236-239. doi:10.1093/beheco/arq224
- Boersma K, Ryer C, Hurst T, Heppell S (2008) Influences of divergent behavioral strategies upon risk allocation in juvenile flatfishes. *Behav Ecol Sociobiol* 62 (12):1959-1968. doi:10.1007/s00265-008-0627-z
- Boissy A, Terlouw C, Le Neindre P (1998) Presence of cues from stressed conspecifics increases reactivity to aversive events in cattle: evidence for the existence of alarm substances in urine. *Physiol Behav* 63 (4):489-495
- Bowler CM, Cushing BS, Carter CS (2002) Social factors regulate female-female aggression and affiliation in prairie voles. *Physiol Behav* 76 (4-5):559-566
- Caldji C, Francis D, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ (2000) The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine

- receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacol* 22 (3):219-229. doi:10.1016/s0893-133x(99)00110-4
- Campbell-Palmer R, Rosell F (2011) The importance of chemical communication studies to mammalian conservation biology: A review. *Biol Conserv* 144 (7):1919-1930. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2011.04.028
- Carter CS, Getz LL (1993) Monogamy and the prairie vole. *Sci Am* 268 (6):100-106
- Daniel TB, Fernández-Juricic E (2010) *Primer of Conservation Behavior*. Palgrave Macmillan Limited,
- de la Maza HM, Wolff JO, Lindsey A (1999) Exposure to strange adults does not cause pregnancy disruption or infanticide in the gray-tailed vole. *Behav Ecol Sociobiol* 45 (2):107-113. doi:10.1007/s002650050544
- Epp KJ, Gabor CR (2008) Innate and Learned Predator Recognition Mediated by Chemical Signals in *Eurycea nana*. *Ethology* 114 (6):607-615. doi:10.1111/j.1439-0310.2008.01494.x
- Ferkin MH (2001) Patterns of sexually distinct scents in *Microtus spp.* *Can J Zool* 79 (9):1621-1625
- Ferkin MH, Ferkin FH, Richmond M (1994) Sources of scent used by prairie voles, *Microtus ochogaster*, to convey sexual identity to conspecifics. *Can J Zool* 72 (12):2205-2209
- Ferkin MH, Johnston RE (1995) Meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, use multiple sources of scent for sex recognition. *Anim Behav* 49 (1):37-44
- Ferkin MH, Li HZ, Leonard ST (2004) Meadow voles and prairie voles differ in the percentage of conspecific marks they over-mark. *Acta Ethol* 7 (1):1-7
- Ferkin MH, Mech SG, Paz-Y-Mino G (2001) Scent marking in meadow voles and prairie voles: a test of three hypotheses. *Behaviour* 138:1319-1336

- Fernandes M, Pita R, Mira A (2008) *Microtus cabreræ*. IUCN Red List of Threatened Species Version 2012.2
- Getz LL, Carter CS (1996) Prairie vole partnerships. *Am Sci* 84 (56-62)
- Getz LL, McGuire B, Carter CS (2005) Social organization and mating system of free-living prairie voles *Microtus ochrogaster*: a review. *Acta Zool Sinica* 51 (2):178-186
- Gorman ML (1990) Scent marking strategies in mammals. *Rev Suisse Zool* 97
- Gosling LM, Roberts SC (2001) Scent-marking by male mammals: Cheat-proof signals to competitors and mates. In: *Advances in the Study of Behavior*, Vol 30, vol 30. *Advances in the Study of Behavior*. Academic Press Inc, San Diego, pp 169-217
- Gosling LM, Roberts SC, Thornton EA, Andrew MJ (2000) Life history costs of olfactory status signalling in mice. *Behav Ecol Sociobiol* 48 (4):328-332
- Gutierrez-Garcia AG, Contreras CM, Mendoza-Lopez MR, Garcia-Barradas O, Cruz-Sanchez S (2007) Urine from stressed rats increases immobility in receptor rats forced to swim: Role of 2-heptanone. *Physiol Behav* 91 (1):166-172
- Hauser R, Wierowski M, Marczak M, Karaszewski B, Wodniak-Ochocinska L (2005) Alarm pheromones as an exponent of emotional state shortly before death - Science fiction or a new challenge? *Forensic SciInt* 155 (2-3):226-230
- Hughes NK, Price CJ, Banks PB (2010) Predators are attracted to the olfactory signals of prey. *Plos One* 5 (9):e13114. doi:10.1371/journal.pone.0013114
- Huntingford FA (2004) Implications of domestication and rearing conditions for the behaviour of cultivated fishes. *J Fish Biol* 65:122-142. doi:10.1111/j.0022-1112.2004.00562.x

- Hurst J, Beynon R (2008) Chemical communication in societies of rodents. In: D'Ettorre P, Hughes DP (eds) Sociobiology of Communication: an interdisciplinary perspective. Oxford University Press, Oxford, pp 97-118
- Hurst JL, Beynon RJ (2004) Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *Bioessays* 26 (12):1288-1298
- Johnston RE, Bullock TA (2001) Individual recognition by use of odours in golden hamsters: the nature of individual representations. *Anim Behav* 61:545-557
- Kelley JL, Magurran AE, Macías García C (2006) Captive breeding promotes aggression in an endangered Mexican fish. *Biol Conserv* 133 (2):169-177. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2006.06.002>
- Kiyokawa Y, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2004) Modulatory role of testosterone in alarm pheromone release by male rats. *Horm Behav* 45 (2):122-127
- Koivula M, Korpimäki E (2001) Do scent marks increase predation risk of microtine rodents? *Oikos* 95 (2):275-281
- Laviola G, Terranova ML (1998) The developmental psychobiology of behavioural plasticity in mice: the role of social experiences in the family unit. *Neurosci Biobehav Rev* 23 (2):197-213
- Lee JSF, Berejikian BA (2008) Effects of the rearing environment on average behaviour and behavioural variation in steelhead. *J Fish Biol* 72 (7):1736-1749. doi:[10.1111/j.1095-8649.2008.01848.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01848.x)
- Linklater WL (2004) Wanted for Conservation Research: Behavioral Ecologists with a Broader Perspective. *Bioscience* 54 (4):352-360. doi:[10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0352:wfcrbe\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0352:wfcrbe]2.0.co;2)

- Luque-Larena JJ, Lopez P (2007) Microhabitat use by wild-ranging Cabrera voles *Microtus cabreræ* as revealed by live trapping. *Euro J Wildlife Res* 53 (3):221-225. doi:10.1007/s10344-006-0084-9
- Mackaysim A, Laing DG (1981) The sources of odors from stressed rats. *Physiol Behav* 27 (3):511-513
- Madison DM, Mcshea WJ (1987) Seasonal changes in reproductive tolerance, spacing, and social organization in meadow voles: a microtine model. *Am Zool* 27 (3):899-908. doi:10.1093/icb/27.3.899
- Mahady S, Wolff J (2002) A field test of the Bruce effect in the monogamous prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Behav Ecol Sociobiol* 52 (1):31-37. doi:10.1007/s00265-002-0484-0
- Margulis SW, Nabong M, Alaks G, Walsh A, Lacy RC (2005) Effects of early experience on subsequent parental behaviour and reproductive success in oldfield mice, *Peromyscus polionotus*. *Anim Behav* 69 (3):627-634. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.04.021
- Mason RT, LeMaster MP, Müller-Schwarze D (2005) Chemical signals in vertebrates 10. Springer,
- McPhee ME (2003a) Effects of Captivity on Response to a Novel Environment in the Oldfield Mouse (*Peromyscus polionotus subgriseus*). *Int J Comp Psychol* 16 (2)
- McPhee ME (2003b) Generations in captivity increases behavioral variance: considerations for captive breeding and reintroduction programs. *Biol Conserv* 115 (1):71-77. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00095-8
- Mira A, Marques CC, Santos SM, Rosario IT, Mathias ML (2008) Environmental determinants of the distribution of the cabreræ vole (*Microtus cabreræ*) in

- Portugal: Implications for conservation. *Mamm Biol* 73 (2):102-110.
doi:10.1016/j.mambio.2006.11.003
- Orlov AV, Gerasimov YV, Lapshin OM (2006) The feeding behaviour of cultured and wild Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in the Louvenga River, Kola Peninsula, Russia. *ICES J Mar Sci* 63 (7):1297-1303. doi:10.1016/j.icesjms.2006.05.004
- Pita R, Beja P, Mira A (2007) Spatial population structure of the cabrera vole in Mediterranean farmland: The relative role of patch and matrix effects. *Biol Conserv* 134 (3):383-392
- Pita R, Mira A, Beja P (2006) Conserving the cabrera vole, *Microtus cabreræ*, in intensively used mediterranean landscapes. *Agr Ecosyst Environ* 115 (1-4):1-5
- Pita R, Mira A, Beja P (2010) Spatial segregation of two vole species (*Arvicola sapidus* and *Microtus cabreræ*) within habitat patches in a highly fragmented farmland landscape. *Eur J Wildlife Res* 56 (4):651-662. doi:10.1007/s10344-009-0360-6
- Pita R, Mira A, Beja P (2011) Assessing habitat differentiation between coexisting species: The role of spatial scale. *Acta Oecol* 37 (2):124-132. doi:10.1016/j.actao.2011.01.006
- Roberts C (2007) Scent marking. In: Wolff JO, Sherman PW (eds) *Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective*. University of Chicago Press, Chicago, p 627
- Roberts SC (2012) On the Relationship between Scent-Marking and Territoriality in Callitrichid Primates. *Int J Primatol* 33 (4):749-761. doi:10.1007/s10764-012-9604-5
- Roberts SC, Gosling LM (2001) The Economic Consequences of Advertising Scent Mark Location on Territories. In: Marchlewska-Koj A, Lepri J, Müller-

- Schwarze D (eds) Chemical Signals in Vertebrates 9. Springer US, pp 11-17.
doi:10.1007/978-1-4615-0671-3_2
- Roberts SC, Gosling LM, Thornton EA, McClung J (2001) Scent-marking by male mice under the risk of predation. *Behav Ecol* 12 (6):698-705.
doi:10.1093/beheco/12.6.698
- Rosario IT, Cardoso PE, Mathias MD (2008) Is habitat selection by the Cabrera vole (*Microtus cabreræ*) related to food preferences? *Mamm Biol* 73 (6):423-429.
doi:10.1016/j.mambio.2008.05.001
- Salvanes AGV, Moberg O, Braithwaite VA (2007) Effects of early experience on group behaviour in fish. *Anim Behav* 74 (4):805-811.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2007.02.007
- Santos SM, Mathias MDL, Mira A, Simoes MP (2007) Vegetation structure and composition of road verge and meadow sites colonized by cabreræ vole (*Microtus Cabreræ* Thomas). *Pol J Ecol* 55 (3):481-493
- Swaigood RR (2007) Current status and future directions of applied behavioral research for animal welfare and conservation. *App Anim Behav Sci* 102 (3):139-162
- Thomas SA, Kaczmarek BK (2002) Scent-marking behaviour by male prairie voles, *Microtus ochrogaster*, in response to the scent of opposite- and same-sex conspecifics. *Behav Process* 60 (1):27-33
- Thomas SA, Wolff JO (2002) Scent marking in voles: a reassessment of over marking, counter marking, and self-advertisement. *Ethology* 108 (1):51-62
- Verheggen FJ, Haubruge E, Mescher MC (2010) Chapter Nine - Alarm Pheromones—Chemical Signaling in Response to Danger. In: Gerald L (ed) *Vitamins & Hormones*, vol Volume 83. Academic Press, pp 215-239

- Vieuille-Thomas C, Signoret JP (1992) Pheromonal transmission of an aversive experience in domestic pig. *J Chem Ecol* 18 (9):1551-1557
- Wang Z, Hulihan TJ, Insel TR (1997) Sexual and social experience is associated with different patterns of behavior and neural activation in male prairie voles. *Brain Res* 767 (2):321-332
- Winslow JT, Hastings N, Carter CS, Harbaugh CR, Insel TR (1993) A role for central vasopressin in pair bonding in monogamous prairie voles. *Nature* 365 (6446):545-548. doi:10.1038/365545a0
- Wolff JO (2003) Laboratory studies with rodents: Facts or artifacts? *Bioscience* 53 (4):421-427
- Wolff JO (2004) Scent marking by voles in response to predation risk: a field-laboratory validation. *Behav Ecol* 15 (2):286-289
- Wolff JO, Mech SG, Thomas SA (2002) Scent marking in female prairie voles: a test of alternative hypotheses. *Ethology* 108 (6):483-494
- Wolff JO, Sherman PW (2007) *Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective*. University of Chicago Press,
- Young RJ (2008) *Environmental Enrichment for Captive Animals*. John Wiley & Sons,